

Aus dem Pharmakologischen Institut der Johannes
Gutenberg - Universität Mainz

Untersuchungen zum Aktivierungseffekt
von Metyrapon auf die
Arzneimittelhydroxylierung in vitro

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der Medizin der
Johannes Gutenberg - Universität Mainz,
den Medizinischen Fachbereichen

vorgelegt von
Karl Jürgen Henrichs
aus Dickendorf

Mainz 1975

Aus dem Pharmakologischen Institut der Johannes
Gutenberg - Universität Mainz

Untersuchungen zum Aktivierungseffekt von Metyrapon auf die Arzneimittelhydroxylierung in vitro

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der Medizin der
Johannes Gutenberg - Universität Mainz,
den Medizinischen Fachbereichen

vorgelegt von
Karl Jürgen Henrichs
aus Dickendorf

Mainz 1975



Fachbereichsdekan: Professor Dr. P. Klein
Referent: Professor Dr. G. F. Kahl
Korreferent: Professor Dr. K. J. Netter
Tag der mündlichen Prüfung: 18. 11. 1975

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
EINLEITUNG	1
Ziel der Arbeit	13
MATERIAL UND METHODEN	14
1. Substanzen	14
2. Pufferlösungen	15
3. Mikrosomenpräparation	15
4. Eiweißbestimmung	16
5. NADPH-regenerierendes System und NADP	17
6. Inkubationsbedingungen	17
7. Messung der Anilinhydroxylierung	18
8. Messung der Acetanilidhydroxylierung	20
9. Statistische Auswertung	22
ERGEBNISSE	23
1. Einfluß von Metyrapon auf die Anilinhydroxylierung	23
2. Einfluß von Metyrapol auf die Anilinhydroxylierung	26
3. Einfluß von Metyrapon auf die Acetanilidhydroxylierung	29
4. Einfluß von Metyrapol auf die Acetanilidhydroxylierung	32
DISKUSSION	34
ZUSAMMENFASSUNG	44
LITERATURVERZEICHNIS	47

Digitized by the Internet Archive
in 2026

EINLEITUNG

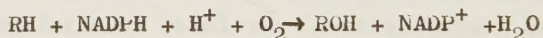
Viele Arzneimittel sind fettlösliche Substanzen, schwache organische Säuren oder Basen, die im Körper so verändert werden, daß sie eine bessere Wasserlöslichkeit erhalten und in Harn und Galle ausgeschieden werden können. Diese Reaktionen verlaufen als Oxydation, Reduktion oder Hydrolyse. So wird eine Reihe von Alkoholen durch die Alkoholdehydrogenase, Succinylcholin durch die Plasma-Pseudocholinesterase, 6-Mercaptopurin durch die Xanthinoxidase umgewandelt.

Die Mehrzahl von Arzneimitteln jedoch wird durch ein Enzymsystem metabolisiert, welches im endoplasmatischen Retikulum (Ergastoplasma) der Leber lokalisiert ist. Hierbei handelt es sich um eine Struktur, die man sich als räumliches Labyrinth innerhalb der Zelle vorzustellen hat. Es ist aus paarweise angeordneten Lamellen von etwa 400-600 Å Gesamtbreite aufgebaut (Bucher, 1973). Die Membranen des endoplasmatischen Retikulums sind glatt oder - indem ihre der Matrix zugewandte Oberfläche mit Ribosomen besetzt ist - körnig. Man unterscheidet einen rauhen (granulären) von einem glatten (agranulären) Teil des endoplasmatischen Retikulums (Bucher, 1973).

Während der rauhwandige Teil eine Rolle bei der Proteinsynthese spielt, sollen am glattwandigen Teil die Enzymsysteme des Arzneimittelabbaus lokalisiert sein (Brodie et al., 1953; Mitoma und Udenfriend, 1955). Beim differentiellen Zentrifugieren von Leberzellhomogenaten erhält man eine Fraktion, die aus Teilchen von 500-1500 Å Durchmesser besteht, die Mikrosomen (Claude, 1938; Palade, 1956). Diese sind keine selbständigen Zellstrukturen, sondern durch Zertrümmerung ent-

standene Äquivalente des endoplasmatischen Retikulums mit voller enzymatischer Aktivität. Die Mikrosomen vermitteln neben esterspaltenden und reduzierenden Reaktionen den oxydativen Arzneimittelabbau. Dazu gehören N-, O- und S-Desalkylierung, Seitenkettenoxydation und Ringhydroxylierung (Gillette, 1962).

Ungeachtet der Frage, ob diese verschiedenen Reaktionen durch ein unspezifisches Enzym oder durch mehrere spezifische Enzyme vermittelt werden, verbrauchen die mikrosomalen Arzneimittelhydroxylasen molekularen Sauerstoff und NADPH (Axelrod, 1955; Mitoma et al., 1956; Gillette et al., 1957; La Du et al., 1955). Dabei wird ein Sauerstoffatom ins Substrat inkorporiert und das andere wird zu Wasser reduziert nach der allgemeinen Formel:



Das mikrosomale Enzymsystem stellt sich somit als mischfunktionelle Oxydase im Sinne der Definition nach Mason (1957) dar. Man sieht es heute als relativ unspezifisches Enzymsystem an, wobei als Schlüsselenzym ein "CO-bindendes Pigment" fungiert. Dieses Pigment aktiviert einerseits den molekularen Sauerstoff, andererseits bindet es die Substrate (Cooper et al., 1965; Imai und Sato, 1966); es wurde von Omura und Sato (1964) differenzspektroskopisch als Cytochrom vom b-Typ identifiziert und Cytochrom P-450 genannt, weil es sich im reduzierten Zustand mit Kohlenmonoxid zu einem inaktiven Komplex verbindet, der bei 450nm ein Absorptionsmaximum aufweist (Conney et al., 1957; Orrenius und Ernster, 1964; Cooper et al., 1965). Cooper et al. (1965) zeigten, daß Licht der Wellenlänge von 450nm den inhibitorischen Effekt von Kohlenmonoxid auf den Arzneimittelmetabolismus wieder

rückgängig zu machen vermag.

Cytochrom P-450 wurde nicht nur in Lebermikrosomen gefunden, sondern auch in Mikrosomen und Mitochondrien von Zellen der Nebennierenrinde. Es hat sich herausgestellt, daß Cytochrom P-450 in der Nebennierenrinde an der Biosynthese der Steroidhormone beteiligt ist (Estabrook et al., 1963; Omura et al., 1965), ja sogar, daß die Steroidbiosynthese über ein weitgehend dem mikrosomalen Enzymsystem der Leber identisches System in der Nebennierenrinde abläuft. Die meisten der die Steroidbiosynthese vermittelnden Hydroxylasen sind jedoch in den Mitochondrien der Nebennierenrinde lokalisiert und nur einige, wie die C_{21} -Hydroxylase, in den Mikrosomen.

Das mikrosomale Enzymsystem der Leber vermittelt neben der Arzneimittelhydroxylierung auch die Inaktivierung der Steroidhormone (Estabrook et al., 1963), die Lipidperoxydation (Orrenius et al., 1964) und die ω -Oxydation der Fettsäuren (Wada et al., 1968; Das et al., 1968). Die Steroide wurden auch als physiologische Substrate der Arzneimittelhydroxylasen bezeichnet (Kuntzman et al., 1964).

Man stellt sich heute vor, daß beim oxydativen Arzneimittelabbau in den Lebermikrosomen das Substrat an die oxydierte Form des Cytochroms P-450 gebunden wird (Estabrook et al., 1971). Der sogenannte "Substrat-Cytochrom P-450-Komplex" wird dann durch ein Flavoprotein, die NADPH-Cytochrom c-Reduktase, reduziert. Dieser "Substrat-reduziertes Cytochrom P-450-Komplex" seinerseits wird oxygeniert und es entsteht ein "Substrat-reduziertes Cytochrom P-450-Sauerstoff-Komplex" (Estabrook et al., 1971). Nach der Abspaltung des oxydierten Substrats

aus diesem Komplex liegt das Cytochrom wieder in freier oxydierter Form vor, und der Redoxzyklus beginnt erneut. Ob zwischen NADPH-Cytochrom c-Reduktase und Cytochrom P-450 ein weiteres Protein, welches das Eisen in nicht hämgebundener Form enthält, eingeschaltet ist, ist bisher umstritten (Miyake et al., 1967; Estabrook et al., 1971).

Für den Transport eines zweiten Elektrons, welches für den Mechanismus der "mischfunktionellen Oxydation" durch Cytochrom P-450 benötigt wird, soll ein weiteres Cytochrom vom b-Typ, das sogenannte Cytochrom b₅ verantwortlich sein (Hildebrandt und Estabrook, 1971). Als Quellen für dieses zweite Elektron kommen sowohl NADPH als auch NADH in Frage (Cohen und Estabrook, 1971); Hildebrandt und Estabrook, 1971). Dabei soll aber NADH für eine größere Menge an reduziertem Cytochrom b₅ während der Arzneimitteloxydation sorgen als NADPH (Correia und Mannering, 1973). Es bleibt aber auch die Möglichkeit, daß das zweite Elektron, wenn es aus dem NADPH-Reservoir stammt, über einen Weg transportiert wird, der Cytochrom b₅ völlig umgeht (Correia und Mannering, 1973).

Der Verbrauch an "zweiten" Elektronen müßte abhängig sein vom Verbrauch an "ersten" Elektronen im Cytochrom P-450-System, da nur der "Substrat-reduziertes Cytochrom P-450-Komplex" den Fluß von Elektronen zur Reduktion des Sauerstoffs zu Wasser ermöglicht (Correia und Mannering, 1973). Dies läßt möglicherweise Rückschlüsse auf die verschiedenen Bindungscharakteristiken der Substrate am Cytochrom P-450-System zu.

Durch Vorbehandlung der Versuchstiere mit einer ganzen Reihe von Substanzen kann man die mikrosomale Enzymaktivität in der Leber steigern. Dazu gehören Barbiturate, Insektizide und polyzyklische Kohlenwasserstoffe (Conney und Burns, 1962).

Als Prototypen dieser Substanzen seien Phenobarbital und 3-Methylcholanthren genannt. Im Gegensatz zu Phenobarbital, das ein breites Spektrum mikrosomaler oxydativer, reduktiver und hydrolytischer Reaktionen beschleunigt, vermag 3-Methylcholanthren nur eine begrenzte Anzahl von Reaktionen zu stimulieren.

Die Vorbehandlung mit Phenobarbital ruft eine Vermehrung des mikrosomalen Proteins um etwa das Zwei-Dreifache hervor, und bewirkt so einen echten Induktionseffekt (Remmer, 1959). Elektronenoptisch stellt sich dieser Vorgang in einer Proliferation der glatten Membranen im endoplasmatischen Retikulum dar (Remmer und Merker, 1963; Fouts und Rogers, 1965). Durch spektrophotometrische Messungen konnte man nachweisen, daß es zu einer Vermehrung des Cytochrom P-450 kommt (Remmer und Merker, 1965; Orrenius und Ernster, 1964). Auch der Gehalt an NADPH-Cytochrom c-Reduktase soll durch Phenobarbital-Vorbehandlung ansteigen (Jick und Shuster, 1966).

Als Ursache des Induktionseffekts nach Vorbehandlung mit 3-Methylcholanthren wird die Zunahme des Gesamtleberproteins angesehen (Arcos et al., 1961). Die größte Spezifität des induzierenden Effekts von polyzyklischen Kohlenwasserstoffen im Vergleich mit Phenobarbital läßt vermuten, daß in der Leber mehrere mischfunktionelle Oxydationssysteme existieren (Shoeman et al., 1973). Diese Annahme wird dadurch gestärkt, daß man nach 3-Methylcholanthren-Vorbehandlung ein "neues Cytochrom P-450", das sogenannte Cytochrom P₁-450, ge-

funden hat (Sladek und Mannering, 1966). Dieses Cytochrom zeigt mit Kohlenmonoxid ein Absorptionsmaximum bei 448nm; es wurde daher auch Cytochrom P-448 genannt. Im einzelnen ist der Mechanismus der selektiven Induktion durch polyzyklische Kohlenwasserstoffe, wie 3-Methylcholanthren, ungeklärt. Es gibt jedoch Hinweise dafür, daß 3-Methylcholanthren und Phenobarbital auf verschiedene Substratbindungsstellen an der mikrosomalen Endoxydase wirken.

Zu einer Unterscheidung der möglichen Bindungsarten von Substraten führten Untersuchungen von Remmer et al. (1966) und Imai und Sato (1966). Sie stellten fest, daß oxydierbare Substanzen in Verbindung mit der mikrosomalen Fraktion am Doppelwellenlängenspektrophotometer zwei generelle Typen von Differenzspektren zeigen, Typ I- und Typ II-Spektren. Typ I-Substrate zeigen ein Differenzspektrum mit Absorptionsmaxima bei Wellenlängen zwischen 385nm und 390nm und Absorptionsminima zwischen 418nm und 427nm. Die Absorptionsmaxima von Typ II-Substraten liegen um 430nm und die Absorptionsminima um 395nm. Typ I- und Typ II-Spektren verhalten sich also nahezu wie Spiegelbilder. Es sind inzwischen viele Substanzen auf ihre Typenzugehörigkeit hin untersucht und entsprechend Tabellen aufgestellt worden (Mannering, 1971).

Viele Typ I-Substrate induzieren den mikrosomalen Arzneimittelabbau (Mannering, 1968); außerdem zeichnen sie sich durch eine hohe Lipophilie aus; dagegen gilt als gemeinsame Eigenschaft vieler Typ II-Substrate ihr hoher Stickstoffgehalt (Schenkman et al., 1967).

Hexobarbital und Amidopyrin werden als Prototypen für Typ I-Substrate angesehen; Acetanilid und Anilin zeigen ein Typ II-Spektrum. Als Ursache für diese Verschie-

denen Bindungsspektren wurde die Existenz zweier Cytochrom P-450-Formen diskutiert (Schenkman et al., 1967). Heute herrscht dagegen die Ansicht vor, daß Substrate an spezifischen Stellen am Cytochrom P-450 gebunden werden, und so unterschiedliche Konformationsänderungen am Hämolekül bewirken, die sich spektral darstellen lassen (Imai und Sato, 1967). Dabei wird das Typ II-Spektrum mit der Bildung eines Ferrihämochromogens in Verbindung gebracht (Schenkman et al., 1967), während das Typ I-Spektrum durch Substratbindung am Lipoproteinanteil des Cytochroms entstehen soll (Schenkman und Sato, 1968).

Mit gereinigtem Cytochrom b₅, dem zweiten mikrosomalen Hämoprotein, werden keine spektralen Wirksamkeiten der Substrate beobachtet.

Die Aktivität der NADPH-Cytochrom c-Reduktase soll sich unter beiden Substrattypen nicht ändern (Sasame und Gillette, 1969), obgleich die NADPH-Oxydation durch Typ I-Substrate gesteigert, durch Typ II-Substrate kaum verändert oder sogar gehemmt wird (Gigon et al., 1969). Dabei beeinflussen Typ II-Substrate unter CO-Begasung die Reduktionsgeschwindigkeit des Cytochroms P-450 im Sinne einer Verlangsamung, dagegen wird die Reduktionsgeschwindigkeit des Cytochroms unter Typ I-Substraten erhöht (Gigon et al., 1969). Diese Autoren konnten außerdem feststellen, daß die Erhöhung der Reduktionsgeschwindigkeit durch ein Typ I-Substrat, Äthylmorphin, weit ausgeprägter ist bei Lebermikrosomen von männlichen Ratten als von weiblichen Ratten.

Substrate der mischfunktionellen Oxydase beeinflussen sich gegenseitig in vielfältiger Weise (Leibman et al., 1969). Anilin, ein Typ II-Substrat, wirkt als ein kompetitiver Hemmstoff auf die Bindung von Hexobar-

bital; auch der Metabolismus von Hexobarbital wird durch Anilin gehemmt (Leibman et al., 1969). Typ I-Substrate dagegen erhöhen das Bindungsvermögen des Cytochroms P-450 für Typ II-Substrate. Die Bindung von Typ I-Substraten wird durch andere Typ I-Substrate auf uneinheitliche Weise beeinflusst; Barbiturate hemmen sich kompetitiv, während zwischen anderen Typ I-Substraten eine nichtkompetitive Hemmung beobachtet wird. Dagegen hemmen sich alle Typ II-Substrate nichtkompetitiv (Leibman et al., 1969). Diese Untersuchungen führten zu der Vorstellung von zwei ineinander überführbaren Formen des Cytochroms P-450, von denen die eine Bindungen sowohl mit Typ I- als auch mit Typ II-Substraten eingehen soll, während die andere Form sich nur mit Typ II-Substraten verbinden soll (Schenkman, 1970; Leibman und Estabrook, 1971).

Sasame und Gillette (1970) meinten, daß die Hemmung des Typ I-Metabolismus durch Typ II-Substrate durch zwei gleichzeitig wirksame Mechanismen bewirkt wird, indem Typ II-Substrate einerseits die Reduktion der Endoxydase verlangsamen und andererseits die Affinität des Cytochroms für Typ I-Substrate verändern. Es ist gezeigt worden, daß bestimmte Substrate den mikrosomalen Stoffwechsel anderer Substrate in vitro auch im Sinne einer Beschleunigung beeinflussen können, d.h. es tritt eine Steigerung des in vitro-Metabolismus ein, ohne daß eine Enzyminduktion stattgefunden hat. Zu diesen Substanzen zählen Äthylisocyanid, Metyrapon und Aceton.

Äthylisocyanid (EtNC), das zur Gruppe der Typ II-Substrate gehört (Kröber et al., 1970), zeigt sowohl eine stimulierende als auch eine hemmende Wirkung auf die

mikrosomale Hydroxylierung von Anilin (Imai und Sato, 1966). Der stimulierende Effekt stellt sich nur bei niedrigen EtNC-Konzentrationen ein und wurde darauf zurückgeführt, daß unter EtNC die Reduktionsgeschwindigkeit von Cytochrom P-450 im Gegensatz zur Wirkung anderer Typ II-Substrate erhöht ist. (Imai und Sato, 1968). Dagegen tritt mit höheren Konzentrationen von EtNC eine Hemmung der Anilinhydroxylierung ein, die mit einer kompetitiven Hemmung der Sauerstoffbindung am Cytochrom erklärt wird (Imai und Sato, 1966).

Metyrapon (2-methyl-1,2-bis-(3-pyridyl)-1-propanon; SU 4885; Metopiron^R) war zunächst als Hemmstoff der Steroidbiosynthese in der Nebennierenrinde (Chart et al., 1958) bekannt, und zwar als spezifischer Inhibitor der C₁₁-Steroidhydroxylase (Liddle et al., 1958; Jenkins et al., 1959). Es stellte sich aber später heraus, daß auch die C₁₈-Hydroxylierung (Kraulis und Birmingham, 1963) ebenso wie die C₁₉-Hydroxylierung (Sanzari und Péron, 1966) durch Metyrapon gehemmt wird; dagegen hemmt es die Hydroxylierung am C₂₁-Atom nicht (Netter et al., 1967).

In der Klinik wurde das Metyrapon im sogenannten Metopiron^R-Test benutzt, um die hypophysären ACTH-Reserven zu beurteilen (Jenny, 1970). Infolge der Hemmung der Steroidhydroxylasen kommt es zum Absinken des Cortisolspiegels im Blut; dies führt auf dem Wege des Feed-back-Mechanismus zwischen Hypophyse und Nebennierenrinde zu einer verstärkten ACTH-Ausschüttung. ACTH wiederum stimuliert die Steroidbiosynthese, die jedoch nur bis zu den 11-Desoxy-Vorstufen abläuft. Diese in Stellung 11 nicht hydroxylierten Vorstufen werden dann im Urin vermehrt ausgeschieden und als

Anteil der 17-OH-Ketosteroide nachgewiesen (Jenny, 1962).

Nachdem man die Verwandtschaft der Arzneimittelhydroxylasen in der Leber mit den Steroidhydroxylasen der Nebennierenrinde erkannt hatte (Kuntzman et al., 1964), lag es nahe, auch in der Leber eine hemmende Wirkung des Metyrapons anzunehmen, die in der Tat nachgewiesen werden konnte. So wird der Metabolismus von Hexobarbital und Amidopyrin durch Metyrapon gehemmt (Leibman, 1969), ebenso die Demethylierung von p-Nitroanisol (Netter et al., 1967). Es wurde gezeigt, daß das Ausmaß der Hemmung der Amidopyrindemethylierung der Hemmstoffkonzentration parallel geht (Netter et al., 1967). Dagegen ist die Wirkung von Metyrapon auf die Hydroxylierung von Acetanilid, einem Typ II-Substrat, je nach der eingesetzten Hemmstoffkonzentration unterschiedlich. Bei Konzentrationen unter 10^{-5} M zeigt Metyrapon keine Wirkung auf den Acetanilidmetabolismus; bei 5×10^{-4} M findet eine Stimulierung der Reaktion statt, die sich dann bei Metyraponkonzentrationen über 10^{-2} M in einen Hemmeffekt umkehrt (Leibman, 1969). Es wurde nachgewiesen, daß Metyrapon weder einen Einfluß auf die NADPH-Oxydation noch auf die NADP-Reduktion hat (Netter et al., 1967). Dagegen könnten die Bindungseigenschaften dieser Substanz Hinweise auf den Mechanismus der Aktivierung geben. Metyrapon, das zur Gruppe der Typ II-Substrate zählt (Netter et al., 1969), kann mit dem reduzierten Cytochrom P-450 eine Bindung eingehen, die sich spektrophotometrisch mit einem Absorptionsmaximum bei 446 nm nachweisen läßt (Hildebrandt et al., 1969). Bei Anwesenheit von Metyrapon in Meß- und Vergleichsküvette läßt sich nach

CO-Begasung der Meßküvette differenzspektrographisch ein Absorptionsmaximum bei 454nm zeigen (Hildebrandt et al., 1969). Daraus schlossen diese Autoren auf die Existenz zweier Cytochromformen, "P-454" und "P-446", wobei "P-446" am Metabolismus der Typ I-Substrate und "P-454" an dem der Typ II-Substrate beteiligt sein soll. Die Autoren nahmen weiter an, daß Metyrapon einen inaktiven "P-446"-Metyrapon-Komplex bildet, so daß vermehrt Elektronen zum "P-454" geleitet würden, und damit für die Typ II-Metabolisierung zur Verfügung ständen. Diese Anschauung muß aber in Frage gestellt werden, nachdem gezeigt werden konnte, daß der 446nm-Gipfel des Absorptionsspektrums nicht allein durch Metyrapon oder seine Metaboliten hervorgerufen wird, sondern auch durch andere Pyridinkörper, deren Effekte auf den Fremdstoffwechsel nicht mit dem des Metyrapons korrelieren (Jonen et al., 1974). Es läßt sich vielmehr zeigen, daß der Gipfel bei 454nm durch die Interferenz der spektralen Veränderungen in Meß- und Vergleichsküvette zustandekommt (Jonen, 1973). Während die Hemmung des Typ I-Substrat-Metabolismus durch Metyrapon mit einer kompetitiven Hemmung an der Bindungsstelle für Typ I-Substrate und Konkurrenz um den aktivierten Sauerstoff erklärt wird (Netter et al., 1969), lassen sich die je nach Hemmstoffkonzentration verschiedenen Wirkungen auf den Typ II-Metabolismus bisher nicht auf eine bekannte Ursache zurückführen.

Metyrapon wird hauptsächlich (Dünges und Kahl, 1970) zum sekundären Alkohol, Metyrapol, unter Vermittlung einer mikrosomalen, NADPH-abhängigen Reduktase metabolisiert (Kahl, 1970). Das reduzierte Metyrapon wirkt

ebenfalls als Inhibitor des Arzneimittelstoffwechsels; die inhibitorischen Eigenschaften sollen nicht so ausgeprägt sein wie die des Ausgangsstoffes (Netter et al., 1969). Die Aktivierung der acetanilidhydroxylierung konnte unter Metyrapol nicht beobachtet werden (Leibman und Ortiz, 1973).

Das wie Metyrapon zu den Ketonen zählende Aceton aktiviert die mikrosomale Hydroxylierung von Anilin (Anders, 1968) ähnlich dem Metyrapon, für das Kahl et al. (1973) eine Aktivierung der Anilinhydroxylierung gezeigt haben. Darüberhinaus wurde eine Vielzahl von Ketonen und Pyridinderivaten auf ihre Wirkung im mikrosomalen Arzneimittelabbau hin untersucht. Dabei konnten sowohl inhibitorische als auch aktivierende Effekte beobachtet werden (Leibman und Ortiz, 1973).

ZIEL DER ARBEIT

Ausgehend von den Untersuchungen Leibmans (1969) soll in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, daß das als Inhibitor des mikrosomalen Arzneimittelstoffwechsels bekannte Metyrapon (2-methyl-1,2-bis-(3-pyridyl)-1-propanon; SU 4885; Metopiron^R) die mikrosomale Arzneimittelhydroxylierung in Lebermikrosomen von Phenobarbital-vorbbehandelten Ratten beschleunigen kann, wenn es den Suspensionen in einer Konzentration von $5 \times 10^{-4} \text{ M}$ zugesetzt wird. Dabei soll anhand zweier Modellreaktionen, der Hydroxylierung von Anilin und der von Acetanilid, dargestellt werden, daß die Substratkonzentration einen entscheidenden Einfluß auf die Aktivierbarkeit oder Hemmbarkeit der Arzneimittelhydroxylierungen in Lebermikrosomen durch Metyrapon ausübt.

Es schließen sich Untersuchungen an, die den Einfluß des Hauptmetaboliten des Metyrapons im endoplasmatischen Retikulum der Leber, des Metyrapols, auf die p-Hydroxylierung von Anilin und Acetanilid darstellen. Die Wirkungen von Metyrapon und Metyrapol sollen mit denen anderer aktivierender Substanzen der Arzneimittelhydroxylierung verglichen werden, um mögliche Bindungsmechanismen des Metyrapons an der mikrosomalen Endoxydase diskutieren zu können.

MATERIAL UND METHODEN

1. Substanzen

Folgende Substanzen wurden benutzt:

Soerensen-Phosphatpuffer-Bestandteile (Fa.E.Merck, Darmstadt)

Natriumhydroxid (Fa.E.Merck, Darmstadt)

Natriumcarbonat wasserfrei (Fa.E.Merck, Darmstadt)

Kochsalz reinst (Fa.E.Merck, Darmstadt)

Diaethylaether und Isoamylalkohol (Fa.E.Merck, Darmstadt)

Acetanilid (MG:135,17) krist.,reinst (Fa.E.Merck, Darmstadt)

N-Acetyl-para-Aminophenol (NAPAP) (MG:151,16) (Fa.C.H. Boehringer, Ingelheim)

Anilin (MG:93,12) (Fa.E.Merck, Darmstadt)

para-Aminophenol (MG:109,12) (Fa.Riedel-De Haen, Seelze-Hannover)

Metyrapon (Metopiron^R) (MG:226) und reduziertes Metyrapon (Metyrapol) wurden von der Firma Ciba, Pharmaceutical Company, Summit, N.J., USA zur Verfügung gestellt. Glucose-6-Phosphat-Dinatriumsalz (G-6-P) (MG:304) der Firma Boehringer & Söhne, Mannheim

Nikotinsäureamid (MG:123,11) der Firma E.Merck, Darmstadt

β -Nikotinamid-adenin-dinukleotidphosphat (NADP) (MG:787) in Form des Dinatriumsalzes von der Firma Boehringer & Söhne, Mannheim

Glucose-6-Phosphatdehydrogenase (G-6-P-DH) der Firma Boehringer & Söhne, Mannheim, Reinheitsgrad II, spezifische Aktivität: 140 E/ml

Folin-und Ciocalteus Phenolreagenz (Fa.E.Merck, Darmstadt)

2. Pufferlösungen

Als Pufferlösungen für die Versuchsansätze wurde Soerensen-Phosphatpuffer, der aus zwei Stammlösungen (Stammlösung A: 0,067 M Monokaliumphosphat, Stammlösung B: 0,067 M Dinatriumphosphat) hergestellt wurde, verwendet. Der pH-Wert des Puffers wurde mit einer Glaselektrode der Firma Schott an einem Digitalmeter (Digi 610) gemessen. Kleinere Abweichungen wurden mit 1N HCL oder 1N NaOH ausgeglichen.

3. Mikrosomenpräparation

Sämtliche Untersuchungen wurden an Rattenlebermikrosomen in vitro durchgeführt.

Die Mikrosomen wurden aus Lebern von 150-170g schweren männlichen Sprague-Dawley-Ratten gewonnen. Die Ratten waren an drei aufeinanderfolgenden Tagen durch intraperitoneale Injektion von 80mg Phenobarbital-Na/kg Körpergewicht in 0,5ml physiologischer Kochsalzlösung vorbehandelt worden. In dieser Zeit stand den Ratten Altromin-Trockenfutter (Fa.Altromin, Lage/Lippe) bis etwa 12 Stunden vor der Tötung, wasser ad libitum zur Verfügung. 20-24 Stunden nach der letzten Injektion wurden die Ratten durch Wirbeldislokation getötet und nach Durchtrennung der Halsgefäße gut ausgeblutet. Die Lebern wurden in situ durch die Pfortader mit einer kalten 0,9%igen NaCl-Lösung 2-3 Minuten lang perfundiert, um möglichst viele Erythrozyten herauszuwaschen. Danach wurden die Lebern entnommen und bei 0-4°C im Kälteraum gewogen, auf das dreifache Gewicht mit einer sogenannten "SVF-Lösung" (Leybold und Staudinger, 1959) (Saccharose 0,25 M, Versen 0,005 M, Tris-Puffer 0,02 M, pH mit HCL auf 7,4 eingestellt) aufgefüllt und mit einem "Ultraturrax" (Fa.Jahnke und Kunkel) homogenisiert.

Das Homogenat wurde 15 Minuten bei 1600xg und danach 30 Minuten lang bei 9000xg in einer Sorvall-Zentrifuge zur Entfernung von Mitochondrien und Zelltrümmern zentrifugiert. Anschließend wurde der 9000xg-Überstand in einer Spinco-Ultrazentrifuge (L2-65B, Fa. Beckman) bei 4°C und 105000xg für 60 Minuten zentrifugiert.

Das Sediment wurde in SVT-Lösung resuspendiert und nochmals bei 105000xg eine Stunde zentrifugiert. Dieser Waschvorgang wurde noch einmal wiederholt. Der nach der dritten Zentrifugation resedimentierte Niederschlag wurde als Mikrosomenfraktion in den Versuchen verwendet.

Alle Fraktionen, die am Tage der Präparation nicht verwendet wurden, wurden bei -20°C eingefroren und vor der Verwendung langsam im Eiswasserbad aufgetaut.

Alle Versuchsreihen wurden mit Mikrosomenfraktionen, die verschiedenen Zellfraktionierungen entstammen, durchgeführt.

4. Eiweißbestimmung

Der Eiweißgehalt der Mikrosomenfraktionen wurde nach der Methode von Lowry et al. (1951) bestimmt.

Bei dieser Bestimmung reagiert das Phenolreagenz nach Folin und Ciocalteu im alkalischen Milieu mit den phenolischen OH-Gruppen der Aminosäuren des Eiweißes, daraus resultiert eine Blaufärbung des Ansatzes. Durch Zugabe von Cu^{++} -Salzen kann die Empfindlichkeit der Reaktion gesteigert werden.

Unsere Ansätze enthielten 50 μl 1:10 verdünnte Mikrosomensuspension, 7 ml 10%ige Na_2CO_3 -Lösung, 1 ml 0,1%ige CuSO_4 -Lösung und 1 ml Aqua bidest.

Diesen Ansätzen wurde genau 30 Minuten nach ihrer Herstellung 1 ml 1:4 verdünntes Phenolreagenz zugesetzt.

Die Ansätze wurden sofort gründlich durchmischt und 5 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach der Abkühlung auf Raumtemperatur wurden die Extinktionen an einem Eppendorf-Photometer bei 578nm gemessen; dabei diente Lab-Trol (Dade Reagents, Inc., USA) mit einer Proteinkonzentration von 7g/100ml nach Verdünnung als Standard.

5. NADPH-regenerierendes System und NADP

Das NADPH-regenerierende System bestand aus Glucose-6-Phosphat, Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase und β -Nicotinamid-adenin-dinucleotidphosphat (NADP).

47,75mg Glucose-6-Phosphat wurden gemeinsam mit 0,125ml Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase in 6,13ml Soerensen-Phosphatpuffer pH 7,4 bzw. 7,8 gelöst.

Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase wurde als 1mg/ml Suspension verwendet; die enzymatische Aktivität betrug 140 Einheiten/ml. In den Versuchen wurden 1,4 U/Ansatz verwendet.

Zur Herstellung einer NADP-Lösung wurden 6,6mg NADP in Form des Dinatriumsalzes in 1ml Aqua bidest. aufgelöst. Die Endkonzentrationen betrugen für NADP 0,333mM und für Glucose-6-Phosphat 5mM.

6. Inkubationsbedingungen

Alle Ansätze erhielten als Fermentquelle 1mg Mikrosomenprotein/ml aus dem oben beschriebenen Präparationsverfahren bei einem Gesamtvolumen von 2,5ml.

Die Inkubation des Acetanilids erfolgte bei einem pH von 7,4, die des Anilins bei einem pH von 7,8, eingestellt durch Soerensen-Phosphatpuffer. (Der pH-Wert wurde mit einer Glaselektrode der Fa. Schott an einem Digitalmeter (Digi 610) gemessen)

Als NADPH-regenerierendes System wurde G-6-P, G-6-P-DH und NADP dem Inkubationsansatz zugefügt (s.o.). Die Inkubation erfolgte in einem Schüttelwasserbad der Firma Köttermann bei einer Temperatur von 30°C. Unter diesen Bedingungen verlief die Zeitumsatzkurve über 30 Minuten linear.

Nach 5-minütiger Präinkubationszeit wurden die Reaktionen durch Substratzusatz gestartet und für 20 Minuten inkubiert.

In jeder Versuchsreihe wurden interne Standards mit-inkubiert.

Die Metyrapon- bzw. Metyrapol-Konzentration im Ansatz betrug 5×10^{-4} M.

Kontrollansätze ohne Zusatz von Metyrapon bzw. Metyrapol wurden bei jedem Versuch in gleicher Weise mit-inkubiert.

Die Reaktion der Anilinhydroxylierung wurde jeweils durch Zusatz von 1,25 ml 20%iger Trichloressigsäure gestoppt, die der Acetanilidhydroxylierung durch Zusatz von 0,5 g NaCl.

7. Messung der Anilinhydroxylierung

Bei der Hydroxylierung des Anilins entsteht als Hauptmetabolit das 4-Hydroxy-Derivat, 4-Hydroxy-Anilin = para-Aminophenol (Brodie und Axelrod, 1948). Zur Bestimmung des entstandenen para-Aminophenol wurde nicht die Methode der Ätherextraktion (Brodie und Axelrod, 1948) gewählt, sondern die Trichloressigsäure-Präzipitationsmethode (Imai und Sato, 1966).

Das Protein des Inkubationsgemisches wurde mit 1,25 ml 20%iger Trichloressigsäure präzipitiert und in einer

Inkubationsschema zur Untersuchung des Aktivierungseffektes von Metyrapon auf die Anilinhydroxylierung

	LW	Anilin					Interne Standards	
		1mM	4mM	8mM	16mM	32mM	Standard I	Standard II
G6P	0,5	0,5 0,5	0,5 0,5	0,5 0,5	0,5 0,5	0,5 0,5	0,5 0,5	0,5 0,5
G6PDH								
NADP	0,1	0,1 0,1	0,1 0,1	0,1 0,1	0,1 0,1	0,1 0,1	0,1 -	0,1 -
Soerensen Puffer 7,8	0,1	0,1 0,6	0,1 0,8	0,1 0,6	0,1 0,6	0,1 0,6	- 0,1	- 0,1
Mikrosomen	0,5	0,5 0,5	0,5 0,5	0,5 0,5	0,5 0,5	0,5 0,5	0,5 0,5	0,5 0,5
Anilin	-	0,8 0,8	0,8 0,8	0,8 0,8	0,8 0,8	0,8 0,8	- -	- -
Puffer (Start)	0,8	- -	- -	- -	- -	- -	0,8 0,8	0,7 0,7
Metyrapon	0,5	0,5 -	0,5 -	0,5 -	0,5 -	0,5 -	0,5 0,5	0,5 0,5
p-Aminophenol	-	- -	- -	- -	- -	- -	0,1 0,1	0,2 0,2

Bei allen Ansätzen, Leerwerte eingeschlossen, wurden Doppelbestimmungen durchgeführt. Die verschiedenen Anilinkonzentrationen wurden durch eine Verdünnungsreihe aus einer Stammlösung, die bei jedem Versuch neu angesetzt wurde, hergestellt. Metyrapon bzw. Metyrapol wurde in einer Konzentration von $2,5 \times 10^{-3} M$ in Soerensen-Phosphatpuffer (pH: 7,8) gelöst und dem Schema entsprechend den Ansätzen zugesetzt. Die Reaktionen wurden nach 5 minütiger Vorinkubation gestartet und genau nach weiteren 20 Minuten durch Zusatz von 1,25ml Trichloressigsäure pro Ansatz gestoppt.

Sorvall-Zentrifuge (Rotor:SE-12) bei 13000 U/min und 4°C 5 Minuten lang abzentrifugiert. 1ml des Überstandes wurde in neue Zentrifugenröhrchen gegeben, in die vorher 1ml Phenolreagenz (250mg Phenol/12,5 1N NaOH/12,5ml Aqua bidest.) einpipettiert worden war. Dabei entstand ein Indophenol-Farbstoff, dessen Extinktion genau nach 30 Minuten in einem Eppendorf-Photometer bei 623nm gemessen wurde.

Zur Bestimmung der para-Aminophenolkonzentration wurde die Eichkurve benutzt.

Diese Methode ist hinlänglich genau und berücksichtigt die Hinweise von Chhabra et al. (1972), da die lösliche Fraktion nicht als G-6-P-DH-Quelle für das NADPH-regenerierende System verwendet wurde, sondern G-6-P-DH-Lösung und NADP nach oben beschriebener Weise den Ansätzen zugefügt wurden.

8. Messung der Acetanilidhydroxylierung

Bei der Hydroxylierung des Acetanilids (Brodie und Axelrod, 1948) entsteht als Reaktionsprodukt vorwiegend para-Hydroxy-Acetanilid = N-Acetyl-para-Aminophenol (Mitoma et al., 1956). Das entstandene N-Acetyl-para-Aminophenol (NA-PAP) wurde nach der Methode von Brodie und Axelrod (1948), modifiziert nach Krisch und Staudinger (1961), gemessen. Im Unterschied zu der ursprünglichen Methode wurden die Reaktionen unter Berücksichtigung von Krisch et al. (1964) nicht mit Trichloressigsäure, sondern mit 500mg festem Kochsalz gestoppt.

Nach Zugabe von 10ml Äther, der 1,5% (V/V) Isoamylalkohol enthielt, wurden die Ansätze 5 Minuten geschüttelt und anschließend in einer Christ-Zentrifuge zentrifugiert.

Inkubationsschema zur Untersuchung des Aktivierungseffekts von Netyrapon auf die Acetanilidhydroxylierung

	LW	Acetanilid 0,5mM		Acetanilid 1mM		Acetanilid 2mM		Acetanilid 4mM		Interne Standards	
										Standard I	Standard II
G-6-P	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
G-6-P-DH	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
NADP	-	-	0,5	-	0,5	-	0,5	-	0,5	-	0,3
Soerensen Puffer 7,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
Mikrosomen	-	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	-	-
Acetanilid	1,0	-	-	-	-	-	-	-	-	0,9	1,0
Puffer (Start)	0,5	0,5	-	0,5	-	0,5	-	0,5	-	0,5	-
Netyrapon	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,1	0,1
NADP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,2	0,2

Bei allen Ansätzen, Leerwerte eingeschlossen, wurden Doppelbestimmungen durchgeführt. Die verschiedenen Acetanilidkonzentrationen wurden durch eine Verdünnungsreihe aus einer Stammlösung, die bei jedem Versuch neu angesetzt wurde, hergestellt. Netyrapon bzw. Netyrapol wurde in einer Konzentration von $2,5 \times 10^{-3}$ M Soerensen-Phosphatpuffer (pH: 7,4) gelöst und dem Schema entsprechend den Ansätzen zugesetzt. Die Reaktionen wurden nach 5 minütiger Vorinkubation durch Substratzusatz gestartet und genau nach weiteren 20 Minuten durch Zusatz von 500mg Kochsalz gestoppt.

8ml des überstehenden Äthers wurden in zweite, mit 2,0ml 1/10N Natronlauge beschickte, Reagenzgläser pipettiert und erneut geschüttelt und zentrifugiert. Anschließend wurde der Äther mit einer wasserstrahlpumpe abgesaugt.

1ml der verbliebenen wäßrigen Phase wurde mit 0,5ml 10%iger Sodalösung (aus wasserfreiem Na_2CO_3) sowie mit 0,5ml 1:5 mit Aqua bidest. verdünntem Reagenz nach Folin und Ciocalteu versetzt.

Dann wurden die Ansätze zur Farbentwicklung 30 Minuten ins Wasserbad mit einer Temperatur von 37°C gestellt.

Die Extinktionen wurden in einem Eppendorf-Photometer bei 578nm gemessen. Zur bestimmung der NAPAP-Konzentration wurde ebenfalls eine Eichkurve benutzt.

9. Statistische Auswertung

Die Mittelwerte stellen das arithmetische Mittel dar. Als Streuungsmaß wurde der mittlere Fehler des Mittelwertes ($s_{\bar{x}}$) angegeben. Die Prüfung auf statistische Unterschiede erfolgte mittels des t-Testes nach Student für unverbundene Stichproben bzw. mit dem Wilcoxon-Test. Die Berechnungen wurden maschinell auf einem Wang-Rechner 700 A nach Programmen des Pharmakologischen Instituts durchgeführt.

ERGEBNISSE

1. Einfluß von Metyrapon auf die Anilinhydroxylierung

Es wurden die Wirkungen von Metyrapon auf die Hydroxylierung von Anilin, einem Typ II-Substrat, in Lebermikrosomen von Phenobarbital-vorbehandelten Ratten untersucht. Die Metyraponkonzentration betrug in allen Ansätzen 5×10^{-4} M, die Substratkonzentrationen lagen zwischen 1mM und 32mM.

Dabei konnte eine biphasische Wirkung von Metyrapon in Abhängigkeit von der Anilinkonzentration festgestellt werden. Bei niedrigeren Substratkonzentrationen wurde eine Hemmung, dagegen bei höheren Substratkonzentrationen eine Aktivierung, zumindest eine teilweise Aufhebung der Substrathemmung, registriert.

Bei der Anilinkonzentration von 1mM hemmte Metyrapon die Anilinhydroxylierung um 48%. Bei 4mM Anilinkonzentration lag die Umsatzhemmung durch Metyrapon bei 33%, bei 8mM nur noch bei 14% und bei 16mM bei 2%. Dagegen fand bei der Substratkonzentration von 32mM in Gegenwart von Metyrapon eine Umsatzsteigerung um 20% statt. Abbildung 1 stellt die Wirkung von Metyrapon auf die Anilinhydroxylierung graphisch dar. In den Kontrollansätzen wurden die höchsten Umsätze bei der Substratkonzentration von 4mM gemessen. Die geringeren Umsätze in höheren Substratkonzentrationen lassen sich möglicherweise auf eine Substrathemmung zurückführen. In Anwesenheit von Metyrapon wurden die höchsten Umsätze bei der Substratkonzentration von 16mM gemessen.

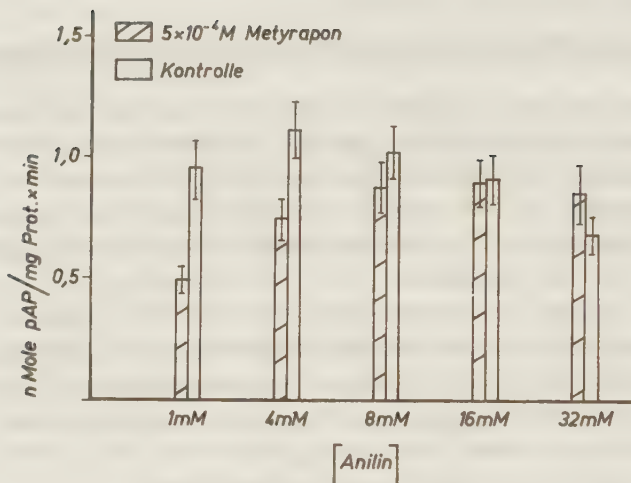


Abbildung 1: Einfluß von Metirapon auf die Anilinhydroxylierung in vitro. Lebermikrosomen (1mg/ml) von Phenobarbital-vorbehandelten Ratten wurden in Gegenwart eines NADPH-regenerierenden Systems bei 30°C bei einem pH von 7,8 inkubiert. Es wurden die Umsätze bei verschiedenen Substratkonzentrationen in Gegenwart von 5×10^{-4} M Metirapon und im Vergleich dazu ohne Metirapon gemessen. Die verwendeten Mikrosomen stammten aus sechs verschiedenen Präparationen. Die Werte stellen das arithmetische Mittel $\pm s_{\bar{x}}$ aller gemessenen Umsätze dar (n=6).

Die Umsatzsteigerung bei der Anilinkonzentration von 32mM in Gegenwart von Metirapon gegenüber den kontrollansätzen konnte statistisch nicht gesichert werden, eine Tendenz ließ sich jedoch in jedem Einzelversuch erkennen (Abb. 2).

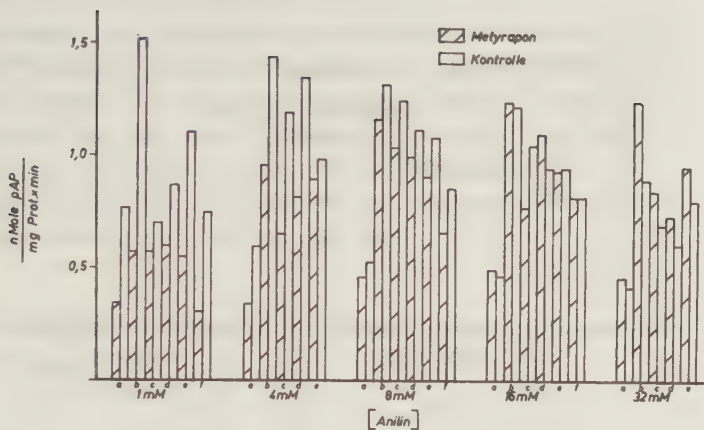


Abbildung 2: Darstellung der in Abb.1 gemittelten Versuchsergebnisse als Einzelumsätze. Säulenpaare, die mit dem gleichen Buchstaben gekennzeichnet sind, wurden in einer Versuchsreihe ermittelt und entstammen derselben Mikrosomenpräparation.

Das Lineweaver-Burk-Diagramm (Abb.3) verdeutlicht die Wirkung von Metirapon auf die Anilinhydroxylierung. Wegen der Abknickung der kurven konnten keine kinetischen Konstanten ermittelt werden.

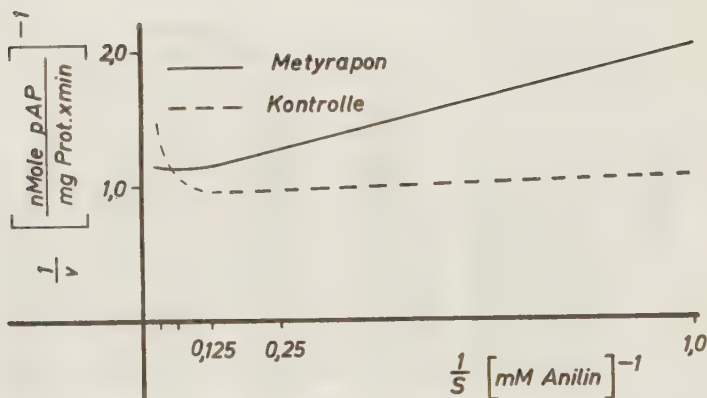


Abbildung 3: Lineweaver-Burk-Diagramm der in Abb.1 dargestellten Umsätze der Anilinhydroxylierung. Es wurden Regressionsgeraden für die Werte errechnet, die zu den Abszissenwerten 0,125, 0,25 und 1,0 gehören (Metyraponkurve: $a=1,19/b=1,001$; Kontrollkurve: $a=1,006/b=0,11$). Korrelationskoeffizient der Metyraponkurve: 0,54; Korrelationskoeffizient der Kontrollkurve: 0,13. ($n=6$).

2. Einfluß von Metyrapol auf die Anilinhydroxylierung

Es wurden die Wirkungen von Metyrapol, des Hauptmetaboliten des Metyrapons im endoplasmatischen Retikulum der Leber, auf die Anilinhydroxylierung in Lebermikrosomen von Phenobarbital-vorbehandelten Ratten untersucht. Die Metyrapolkonzentration betrug in allen Ansätzen $5 \times 10^{-4} M$, die Substratkonzentrationen lagen zwischen 1mM und 52mM.

Auch Metyrapol zeigte eine biphasische Wirkung in Abhängigkeit von der Anilinkonzentration, ähnlich der von Metyrapon.

Bei Substratkonzentrationen von 1mM betrug die Hemmung

50%, bei 4mM 14%, bei 8mM nur noch 3%.

In Gegenwart von reduziertem Metyrapon war schon bei der Anilinkonzentration von 16mM ein um 28% höherer Umsatz gegenüber den entsprechenden Kontrollansätzen zu verzeichnen. Bei der Anilinkonzentration von 32mM betrug die Umsatzsteigerung durch Metyrapol 28%.

Abbildung 4 stellt die Wirkung von Metyrapol auf die Anilinhydroxylierung graphisch dar.

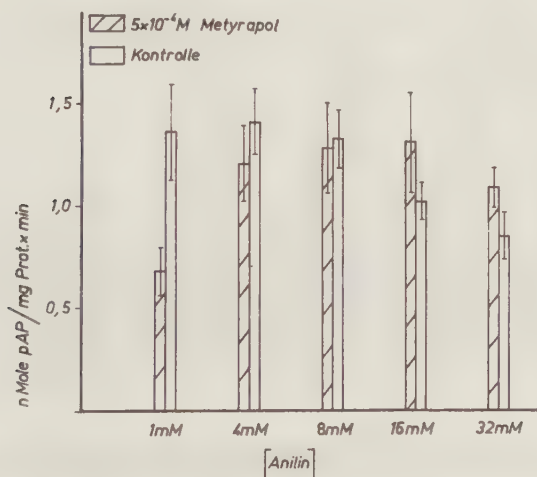


Abbildung 4:Einfluß von Metyrapol auf die Anilinhydroxylierung in vitro. Lebermikrosomen (1mg/ml) von Phenobarbital-vorbehandelten Ratten wurden in Gegenwart eines NADPH-regenerierenden Systems bei 30°C bei einem pH von 7,8 inkubiert.

Es wurden die Umsätze bei verschiedenen Substratkonzentrationen in Gegenwart von 5×10^{-4} M Metyrapol und im Vergleich dazu ohne Metyrapol gemessen. Die verwendeten Mikrosomen stammten aus sechs verschiedenen Präparationen.

Die Werte stellen das arithmetische Mittel $\pm s_{\bar{x}}$ aller gemessenen Umsätze dar (n=6).

Die Umsatzsteigerung bei der Anilinkonzentration von 32mM in Gegenwart von Metyrapol gegenüber den Kontrollansätzen konnte statistisch nicht gesichert werden, eine Tendenz ließ sich jedoch in jedem Einzelversuch erkennen (Abb.5).

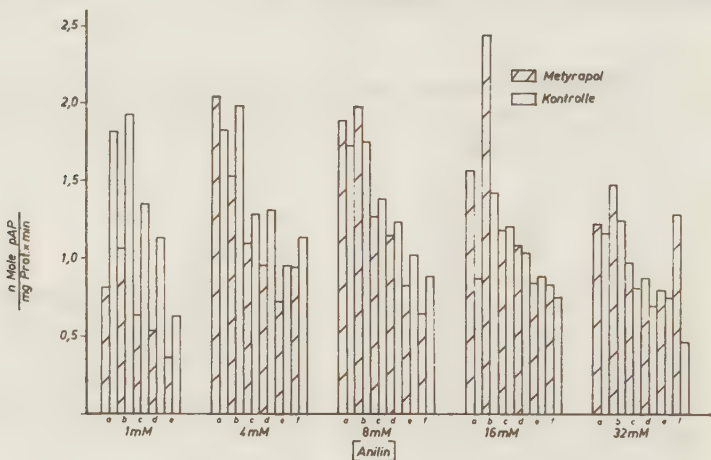


Abbildung 5: Darstellung der in Abb.4 gemittelten Versuchsergebnisse als Einzelumsätze. Säulenpaare, die mit dem gleichen Buchstaben gekennzeichnet sind, wurden in einer Versuchsreihe ermittelt und entstammen derselben Mikrosomenpräparation.

Das Lineweaver-Burk-Diagramm (Abb.6) verdeutlicht die Wirkung von Metyrapol auf die Anilinhydroxylierung. wegen der Abknickung der Kurven konnten keine kinetischen Konstanten ermittelt werden.

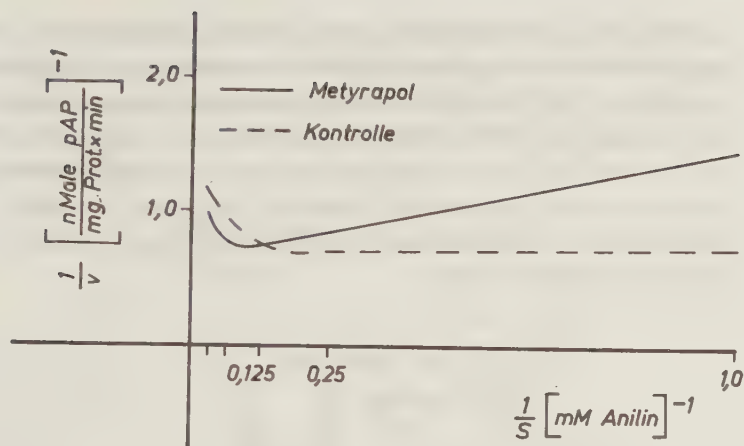


Abbildung 6: Lineweaver-Burk-Diagramm der in Abb.4 dargestellten Umsätze der Anilinhydroxylierung. Es wurden Regressionsgeraden für die Werte errechnet, die zu den Abszissenwerten 0,125, 0,25 und 1,0 gehören (Metyrapolkurve: $a=0,756/b=0,909$; kontrollkurve: $a=0,762/b=0,091$). Korrelationskoeffizient der Metyrapolkurve: 0,60; Korrelationskoeffizient der Kontrollkurve: 0,12 ($n=6$).

3. Einfluß von Metyrapon auf die Acetanilidhydroxylierung

Es wurden die Wirkungen von Metyrapon auf die Hydroxylierung von Acetanilid, einem weiteren Typ II-Substrat, in Lebermikrosomen von Phenobarbital-vorbehandelten Ratten untersucht. Die Metyraponkonzentration betrug ebenfalls in allen Ansätzen $5 \times 10^{-4} \text{ N}$, die gewählten Substratkonzentrationen waren 0,5 mM, 1 mM, 2 mM und 4 mM. Dabei konnte eine biphasische Wirkung von Metyrapon in Abhängigkeit von der Acetanilidkonzentration festgestellt werden. Bei niedrigeren Substratkonzentrationen wurde eine Hemmung, dagegen bei höheren Substratkonzentrationen eine Aktivierung registriert.

Bei der Acetanilidkonzentration von 0,5mM wurde in Gegenwart von Metyrapon ein um 13% geringerer Umsatz gegenüber den kontrollansätzen gemessen. Dagegen lag der Umsatz bei der Substratkonzentration von 1mM um 3%, bei der von 2mM um 9% und bei der von 4mM um 21% höher als der der kontrollansätze. Abbildung 7 stellt die Wirkung von Metyrapon auf die Acetanilidhydroxylierung graphisch dar.

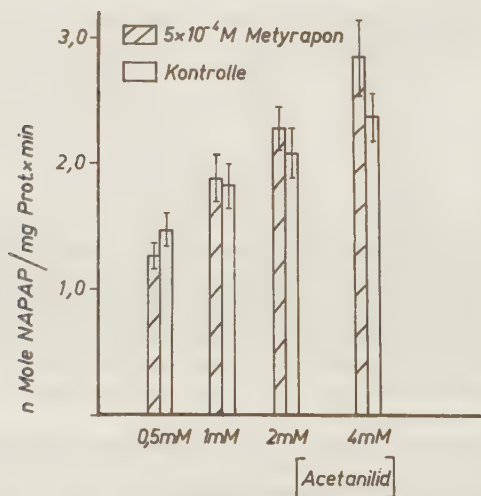


Abbildung 7: Einfluß von Metyrapon auf die Acetanilidhydroxylierung in vitro. Lebermikrosomen (1mg/ml) von Phenobarbital-vorbehandelten Ratten wurden in Gegenwart eines NADPH-regenerierenden Systems bei 30°C bei einem pH von 7,4 inkubiert.

Es wurden die Umsätze bei verschiedenen Substratkonzentrationen in Gegenwart von 5×10^{-4} M Metyrapon und im Vergleich dazu ohne Metyrapon gemessen. Die verwendeten Mikrosomen stammten aus vier verschiedenen Präparationen.

Die Werte stellen das arithmetische Mittel $\pm s_{\bar{x}}$ aller gemessenen Umsätze dar (n=4).

Die aktivierende Wirkung von Metyrapon auf die Acetanilidhydroxylierung bei höheren Substratkonzentrationen konnte statistisch nicht gesichert werden, eine Tendenz ließ sich jedoch in jedem Einzelversuch erkennen (Abb.8).

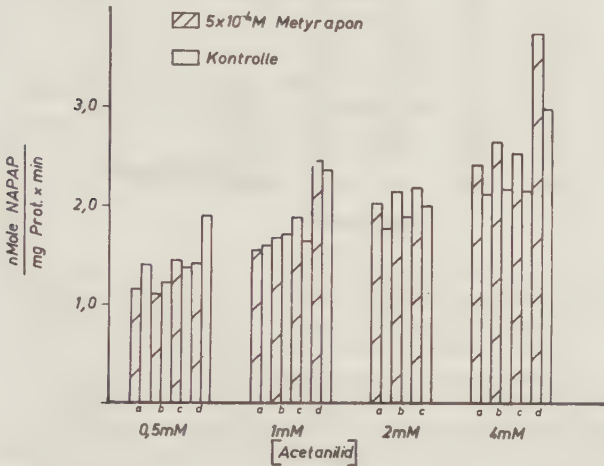


Abbildung 8: Darstellung der in Abb.7 gemittelten Versuchsergebnisse als Einzelumsätze. Säulenpaare, die mit dem gleichen Buchstaben gekennzeichnet sind, wurden in einer Versuchsreihe ermittelt und entstammen derselben Mikrosomenpräparation.

Das Lineweaver-Burk-Diagramm (Abb.9) verdeutlicht die Wirkung von Metyrapon auf die Acetanilidhydroxylierung.

Als K_m der Kontrollansätze wurde 0,35mM bei einer maximalen Umsatzgeschwindigkeit von 2,45 $\frac{\text{nMole NAPAP}}{\text{min} \times \text{mg Prot.}}$ gemessen. In Gegenwart von Metyrapon ergab sich eine K_m von 0,81mM und die maximale Umsatzgeschwindigkeit betrug 3,24 $\frac{\text{nMole NAPAP}}{\text{min} \times \text{mg Prot.}}$.

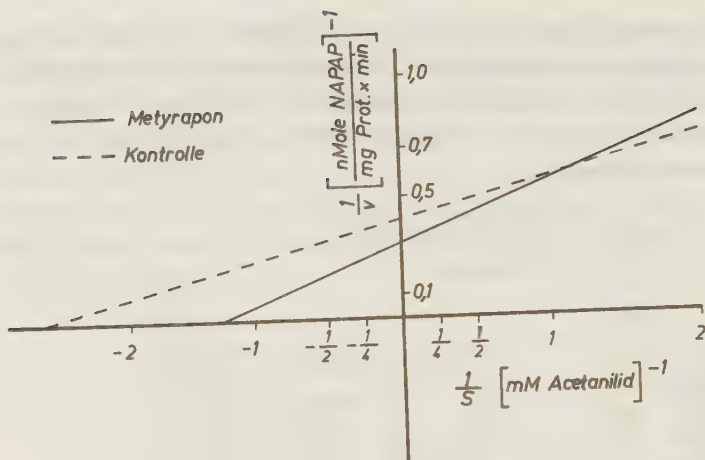


Abbildung 9: Lineweaver-Burk-Diagramm der in Abb.7 dargestellten Umsätze der Acetanilidhydroxylierung. Für beide Geraden wurde eine Regression errechnet (Metyraponkurve: $a=0,308/b=0,247$; Kontrollkurve: $a=0,406/b=0,149$). Korrelationskoeffizient der Metyraponkurve: 0,90; Korrelationskoeffizient der Kontrollkurve: 0,77. ($n=4$).

4. Einfluß von Metyrapol auf die Acetanilidhydroxylierung

Im Gegensatz zur biphasischen Wirkung des Metyrapols auf die Anilinhydroxylierung wurde bei der Acetanilidhydroxylierung lediglich eine Umsatzhemmung in allen Substratkonzentrationen registriert. Damit konnten die Untersuchungen von Leibman und Ortiz (1973) bestätigt werden. Allerdings war die Umsatzhemmung in oberen Substratkonzentrationen geringer als in unteren. Abbildung 10 stellt die Wirkung von Metyrapol auf die Acetanilidhydroxylierung graphisch dar. Das Lineweaver-Burk-Diagramm zu diesen Umsätzen zeigt Abbildung 11.

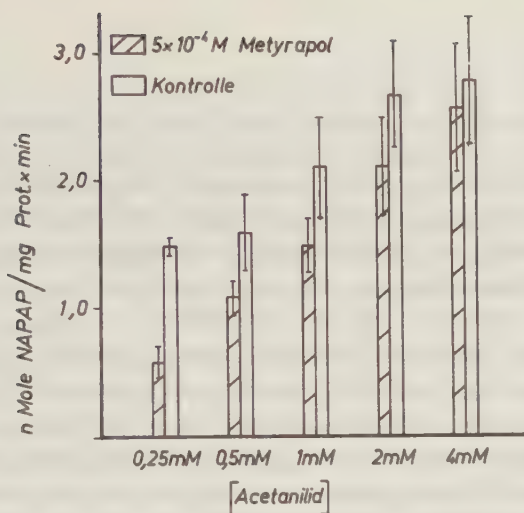


Abbildung 10: Einfluß von Metyrapol auf die Acetanilidhydroxylierung in vitro. Lebermikrosomen (1mg/ml) von Phenobarbital-vorbehandelten Ratten wurden in Gegenwart eines NADPH-regenerierenden Systems bei 30°C bei einem pH von 7,4 inkubiert.

Es wurden die Umsätze bei verschiedenen Substratkonzentrationen in Gegenwart von 5×10^{-4} M Metyrapol und im Vergleich dazu ohne Metyrapol gemessen. Die verwendeten Mikrosomen stammten aus drei verschiedenen Präparationen. Die Werte stellen das arithmetische Mittel $\pm s_x$ der gemessenen Umsätze dar (n=3).

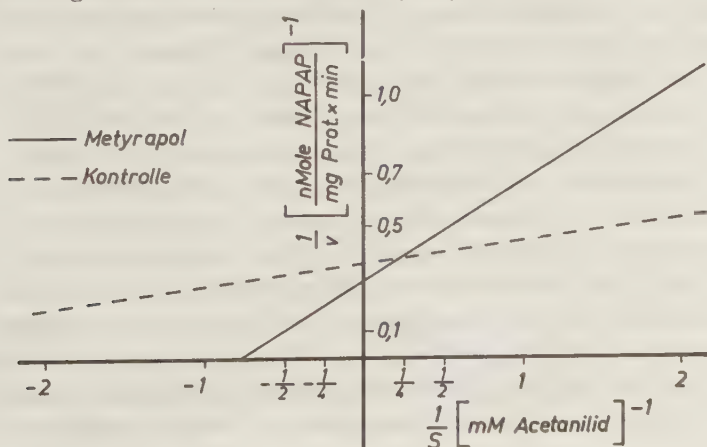


Abbildung 11: Lineweaver-Burk-Diagramm der in Abb. 10 dargestellten Umsätze der Acetanilidhydroxylierung. Für beide Geraden wurde eine Regression errechnet (Metyrapolkurve: $a=0,291/b=0,396$; Kontrollkurve: $a=0,397/b=0,082$). Korrelationskoeffizient der Metyrapolkurve: 0,88; Korrelationskoeffizient der Kontrollkurve: 0,68. (n=3).

DISKUSSION

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, daß das als Inhibitor des mikrosomalen Arzneimittelstoffwechsels bekannte Pyridinderivat Metyrapon in Rattenlebermikrosomen die p-Hydroxylierung von Anilin und Acetanilid beschleunigen kann, wenn es den mikrosomalen Suspensionen in einer Konzentration von 0,5mM zugesetzt wird. Eine Beschleunigung der NAPAP-Bildung aus Acetanilid im 9000xg-Überstand durch Metyraponkonzentrationen unter 10^{-2} M war auch von Leibman (1969) nachgewiesen worden. Das Ausmaß der Aktivierung war in den Untersuchungen von Leibman allerdings deutlich größer als in unseren Versuchen:

Die Acetanilidumsatzsteigerung durch Metyrapon bei 4min Substratkonzentration betrug im 9000xg-Überstand von phenobarbitalvorbehandelten Rattenlebern etwa 80%, während von uns in Mikrosomen eine Aktivierung um 20% nachgewiesen werden konnte.

Zwei Befunde waren bei unseren Untersuchungen bemerkenswert und können möglicherweise Gesichtspunkte zur Diskussion des Aktivierungsmechanismus beitragen:

- 1) Die Anilinhydroxylierung, jedoch nicht die Acetanilidhydroxylierung, wird auch durch den an der aliphatischen Metogruppe reduzierten Metaboliten des Metyrapons gesteigert. Unsere Daten zur Acetanilidhydroxylierung stimmen mit denen von Leibman und Ortiz (1973) überein. Diese Autoren konnten ebenfalls bei verschiedenen Konzentrationen von reduziertem Metyrapon in den Ansätzen keine Aktivierung dieser Reaktion erzielen. In Anbetracht dieser früheren Befunde war das Auffinden einer aktivierenden Wirkung des Metyraponmetaboliten ein unerwartetes Er-

gebnis.

Bisher konnte nur über eine Hemmung des Arzneimittel-metabolismus durch reduziertes Metyrapon berichtet werden. Reduziertes Metyrapon erwies sich als ein Inhibitor der oxydativen Demethylierung; die inhibitorischen Eigenschaften waren jedoch nicht so ausgeprägt wie die des Metyrapons selbst (Netter et al., 1969).

- 2) Einen entscheidenden Einfluß auf die Aktivierbarkeit der Hydroxylierungsreaktionen übt die Substratkonzentration aus. Die Anilinhydroxylierung wird bei Anilinkonzentrationen zwischen 1 und 8 mM sowohl durch Metyrapon als auch durch reduziertes Metyrapon gehemmt. Bei einer Substratkonzentration von 16 mM bleibt die Bildungsgeschwindigkeit von p-Aminophenol durch beide Substanzen unbeeinflusst, und erst bei einer Anilinkonzentration von 32 mM kann eine Aktivierung erzielt werden. Ein ähnliches Muster ergibt sich bei der Untersuchung der Beeinflussbarkeit der Acetanilidhydroxylierung durch Metyrapon: Bei 0,5 und 1 mM Acetanilid findet sich eine deutliche Hemmung der NAPht-Bildung, bei 2 mM verändert Metyrapon die Hydroxylierungsgeschwindigkeit nicht, aber bei einer Substratkonzentration von 4 mM kommt es zu einer Beschleunigung. Dabei fällt auf, daß bei der Anilinhydroxylierung die Aktivierung erst in einem Bereich möglich ist, in dem bereits eine deutliche Substrathemmung zu verzeichnen ist. So lag die höchste Aktivität der Kontrollansätze bei einer Anilinkonzentration von 4 mM, während in Anwesenheit von Metyrapon die höchste Aktivität bei 16 mM gemessen werden konnte. Diese Angaben stimmen mit denen anderer Autoren unseres Labors überein (Kahl et al., 1973).

Im Gegensatz dazu wird eine umsatzbeschleunigende Wirkung von Metyrapon bei der Acetanilidhydroxylierung auch dann beobachtet, wenn noch keine Substrathemmung vorliegt.

Unsere Daten zum Acetanilidstoffwechsel weisen im Hinblick auf den Einfluß der Substratkonzentration einige Unterschiede zu den von Leibman und Ortiz (1973) publizierten Ergebnissen auf. Bei diesen Autoren aktivierte Metyrapon, wenn es in einer Konzentration von 2mM vorlag, die Acetanilidhydroxylierung bei allen Substratkonzentrationen zwischen 0,5mM und 2,5mM. Eine Erklärung für diese Diskrepanz konnte bisher nicht gefunden werden.

Enzymkinetische Parameter konnten von uns nur für den Einfluß von Metyrapon auf die NAPAL -Bildung bestimmt werden. Wir fanden in Anwesenheit des Aktivators eine größere Michaeliskonstante und eine höhere maximale Umsatzgeschwindigkeit gegenüber Kontrollansätzen. Demgegenüber hatten Leibman und Ortiz (1973) unter dem Einfluß von 2mM Metyrapon lediglich eine Steigerung der maximalen Umsatzgeschwindigkeit beobachtet, während die Michaeliskonstante unverändert blieb. Für die Steigerung der Hydroxylierungsgeschwindigkeit von Anilin durch Aceton in vitro konnte dagegen eine Zunahme beider kinetischer Konstanten festgestellt werden (Anders, 1969).

Enzymkinetische Konstanten für die Hydroxylierung von Anilin ließen sich wegen der ausgeprägten Substrathemmung mit Hilfe des Lineweaver-Burk-Diagramms nicht ermitteln.

Obwohl die Nachweismethode mit dem Folin-Ciocalteu - Reagenz, die bei den Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit angewendet wurden (Imai und Sato, 1966), relativ

unspezifisch ist, besteht für die Annahme, bei den beschriebenen Effekten handle es sich um mögliche Scheineffekte, die durch Metyrapon oder seine Metaboliten hervorgerufen werden könnte, kein Anhalt.

Theoretisch besteht die Möglichkeit, daß ein kürzlich aufgefundenes, auf oxydativem Weg entstehendes Stoffwechselprodukt des Metyrapons (R. Kahl et al., 1974), dessen chemische Struktur noch unaufgeklärt ist, ebenfalls eine Hydroxylgruppe mit phenolischem Charakter besitzt und deshalb genau wie p-Aminophenol und NAPAP bei den von uns verwendeten Bestimmungsmethoden eine Blaufärbung hervorruft. Dieser mögliche Störfaktor ist jedoch in unserem Labor für die Acetanilidhydroxylierung durch entsprechende Kontrollversuche ausgeschlossen worden (Nissen, 1974).

Die Beschleunigung der Acetanilidhydroxylierung durch Metyrapon ist auch an der isoliert perfundierten Rattenleber nachgewiesen worden (Nissen, 1974). Am Ganztier steht ein solcher Nachweis bisher noch aus. Wenn sich auch dabei eine schnellere Ausscheidung von NAPAP bzw. p-Aminophenol und deren weiteren Stoffwechselprodukten zeigen ließe, so müßte die Frage nach der klinischen Bedeutung des Aktivierungsphänomens gestellt werden. Es wäre denkbar, daß eine Entgiftungsbeschleunigung z.B. bei einer Anilinvergiftung durch die entsprechenden Metyraponkonzentrationen auch beim Menschen zu erreichen wäre. Allerdings dürfte die ausgeprägte Wirkung von Metyrapon auf die Funktion des Hypophysenvorderlappen-Nebennierenrindensystems einer solchen Anwendung im Wege stehen. Auch unter den anderen Substanzen, für die eine aktivierende Wirkung auf den Stoffwechsel aromatischer Amine sichergestellt worden ist, findet

sich keine, die indifferent genug wäre, um eine klinische Anwendung zu erlauben. Es handelt sich im Gegenteil bei diesen um toxische Stoffe, wie Aceton (Anders, 1969), Paraoxon (Stevens et al., 1972) und Äthylisocyanid (Imai und Sato, 1966).

Zur Erklärung sowohl der inhibitorischen als auch der aktivierenden Wirkung von Metyrapon auf den mikrosomalen Arzneimittelstoffwechsel steht eine Reihe von Hypothesen zur Verfügung, die allerdings durchweg experimentell nicht ausreichend gesichert sind. Als Mechanismen der Hemmwirkung sind im wesentlichen drei Effekte des Metyrapons diskutiert worden:

- 1) Die Substanz ist ein Ligand des dreiwertigen Hämeisens und vermag als solcher die Reduktionsgeschwindigkeit des Cytochroms P-450 herabzusetzen (Gigon et al., 1969).
- 2) Auch an das reduzierte Cytochrom P-450 wird Metyrapon ähnlich wie Kohlenmonoxid gebunden (Hildebrandt et al., 1969), und es ist wahrscheinlich, daß es ebenso wie das Kohlenmonoxid auf diese Weise zu einer teilweisen Inaktivierung des Cytochroms führt.
- 3) Demgegenüber ist die Möglichkeit, daß der oxydative Stoffwechsel des Metyrapons (R. Kahl et al., 1974) mit dem Stoffwechsel anderer Substrate in Konkurrenz tritt, eher als gering einzuschätzen, da die inhibitorische Wirkung bereits in solchen Metyraponkonzentrationen auftritt, bei denen ein oxydativer Stoffwechsel des Inhibitors noch nicht nachzuweisen ist.

Zur Erklärung der Aktivierung des Typ II-Substrat-Stoffwechsels durch Metyrapon können folgende Vorstellungen herangezogen werden:

- 1) Der Effekt steht im ursächlichen Zusammenhang mit der Ketonstrukturen der Substanz.

- 2) Für den Stoffwechsel des Anilins und verwandter Substrate ist eine spezielle Cytochrom P-450-Form verantwortlich, der infolge einer Hemmung des Elektronenflusses zum "normalen" Cytochrom P-450 durch Metyrapon vermehrt reduzierende Äquivalente zur Verfügung stehen.
- 3) Für den Stoffwechsel von Typ II-Substraten sind zwei Enzyme verantwortlich, von denen eines durch Metyrapon unterdrückt, das andere jedoch demaskiert wird.
- 4) Die Aktivierung hängt mit einer Hemmung der Lipidperoxydation durch Metyrapon zusammen.
- 5) Durch die Besetzung der Typ II-Bindungsstelle am Hämeisen durch Metyrapon werden Anilin bzw. Acetanilid vermehrt an der Typ I-Bindungsstelle gebunden und abgebaut.

zu1: Leibman und Ortiz (1973) untersuchten verschiedene Pyridyl-Alkyl-Ketone hinsichtlich ihrer Einflüsse auf die Acetanilidhydroxylierung. Dabei stellten sie fest, daß in Gegenwart von 2-Pyridyl-Ketonen höhere Umsätze der Acetanilidhydroxylierung gemessen wurden als in entsprechenden Kontrollansätzen, während die 3- und 4-Pyridyl-Ketone Umsatzhemmungen hervorriefen. Diese Ergebnisse waren überraschend, da Metyrapon selbst ein 3-Pyridyl-Keton ist. Unabhängig von dieser Diskrepanz hatten jedoch die Untersuchungen von Leibman und Ortiz (1973) klargestellt, daß außer dem Metyrapon eine ganze Reihe anderer Pyridyl-Ketone die Fähigkeit zu einer Stoffwechselbeschleunigung *in vitro* aufweisen. Auch für Ketone, die nicht zu den Pyridinderivaten gehören, gilt diese Beobachtung. Acetophenon aktivierte die mikrosomale Acetanilidhydroxylierung in einer ähnlichen

Weise wie Metyrapon (Leibman und Ortiz, 1973). Acetophenon wird - wie Metyrapon - in der Leber reduziert (Leibman, 1971). Das reduzierte Produkt des Acetophenonmetabolismus zeigt - wie reduziertes Metyrapon - ausschließlich inhibitorische Eigenschaften bei der Acetanilidhydroxylierung (Leibman und Ortiz, 1973). Schließlich ist in diesem Zusammenhang auch das Aceton zu nennen, dessen Keto-Gruppe theoretisch eine ähnliche Rolle spielen könnte wie die Carbonylgruppen der vorher genannten Substanzen. Es muß jedoch darauf hingewiesen werden, daß viele Substanzen mit Carbonylgruppen aber nicht die Fähigkeit zur Aktivierung haben (Anders, 1968). In dieser Arbeit konnte dagegen dargestellt werden, daß Metyrapol, das an der Carbonylgruppe zum entsprechenden sekundären Alkohol reduzierte Metyrapon, die Hydroxylierung von Anilin zu steigern vermag. Damit erscheint es unwahrscheinlich, daß der Ketogruppe eine allgemeine Bedeutung bei dem Phänomen der Stoffwechselbeschleunigung in vitro zukommt.

zu2: Hildebrandt et al. (1969) versuchten den aktivierenden Effekt von Metyrapon auf die Typ II-Substrat-Hydroxylierung zu erklären, indem sie eine Verschiebung des Gleichgewichts von zwei funktionell verschiedenen Formen des Cytochroms P-450 durch Metyrapon annahmen. In Anwesenheit von Metyrapon sollten vermehrt Elektronen einem sogenannten "Cytochrom P-454", das für die Metabolisierung der Typ II-Substrate verantwortlich gemacht wurde, zufließen, und dadurch sollte die Umsatzsteigerung resultieren. Eine Reihe von Erwägungen spricht gegen eine solche Hypothese.

Zum einen sind die spektralen Befunde, die zur Postulierung des sogenannten "Cytochroms P-454" führten, mit gewissen Mängeln der Differenzspektroskopie, wie sie beim Arbeiten mit trüben Medien angewandt werden muß, behaftet und nehmen bei einer näheren Analyse den Charakter von Scheineffekten an (Jonen, 1973). Darüberhinaus dürfte es auch schwierig sein, die Veränderungen der enzymkinetischen Parameter K_m und V_{max} , die wir bei der Metyranonwirkung ebenso gefunden haben wie Anders (1968) bei der Acetonwirkung, mit der Vorstellung eines einzigen Bindungsortes für die betroffenen Typ II-Substrate in Einklang zu bringen. Auch das Phänomen der Abhängigkeit der Aktivierbarkeit von der Substratkonzentration findet durch dieses Modell keine Erklärung.

zu3: Im Zusammenhang mit Befunden zur aktivierenden Wirkung von Aceton, das sowohl in vitro (Anders, 1968) als auch kurz nach Verabreichung in vivo (Clark und Powis, 1974) die p-Hydroxylierung von Anilin zu beschleunigen vermag, wurde angenommen, daß in den Lebermikrosomen zwei Hydroxylasen existieren, die eine mit einer niedrigen Michaeliskonstanten und Umsatzgeschwindigkeit und einer leichten Hemmbarkeit durch Aceton, die andere mit einer hohen Michaeliskonstanten und Umsatzgeschwindigkeit und relativer Unempfindlichkeit gegenüber Aceton (Anders, 1968; Anders, 1972). In Gegenwart von Aceton werde die eine Hydroxylase gehemmt, die andere durch diesen Vorgang demaskiert, wodurch die Erhöhungen der Michaeliskonstanten und der Umsatzgeschwindigkeit erklärt seien. Ein solcher Mechanismus könnte auch für die Wirkung von Metyranon in Betracht kommen.

zu4: Die in den Mikrosomen ablaufende Lipidperoxydation hat einen Abbau des Cytochroms P-450 zur Folge. Dementsprechend müßte eine Substanz, die die Lipidperoxydation zu hemmen vermag, den Umsatz eines Fremdstoffes gegenüber Kontrollansätzen dadurch vergrößern, daß sie den Bestand an Cytochrom P-450 garantiert. Allerdings wäre anzunehmen, daß sich ein solcher Effekt ebenso begünstigend auf den Abbau von Typ I-Substraten auswirkt wie auf den von Typ II-Substraten. Zudem läßt sich unsere Beobachtung, daß die Beschleunigung durch Metyrapon von der Substratkonzentration modifiziert wird, nur schwer mit einer Erklärung der Aktivierung durch die Hemmung der Lipidperoxydation in Einklang bringen.

zu5: Eine Reihe von Befunden deutet darauf hin, daß die Aktivierung des Anilin- und Acetanilidstoffwechsels durch Aceton auf die Existenz einer intakten Typ I-Bindungsstelle am Apoproteinanteil des Cytochroms P-450 angewiesen ist. So hebt eine Zerstörung dieser Bindungsstelle durch Behandlung der Mikrosomen mit Phospholipase die Aktivierbarkeit der Anilidhydroxylierung durch Aceton auf (Vainio und Hänninen, 1972). Ebenso verhindert eine Vorbehandlung der Versuchstiere mit polyzyklischen Kohlenwasserstoffen wie 3-Methylcholanthren, die zu einer beträchtlichen Verminderung der Typ I-Bindung führt (Chaplin und Mannering, 1970), die beschleunigende Wirkung von Aceton auf den Anilinmetabolismus (Powis und Boobis, 1975). Diese Befunde führen zu folgender Vorstellung über den Mechanismus der Aktivierung: Anilin und Acetanilid werden als Substrate der mischfunktio-

nellen Oxydase an der Typ I-Bindungsstelle gebunden und werden auf diesem Wege in den Hydroxylierungsprozeß eingeschleust. Darüberhinaus werden sie aber auch an der Typ II-Bindungsstelle am Hämeisen gebunden. Diese Interaktion mit dem Cytochrom P-450 ist so dominierend, daß bei Zugabe der Typ II-Substrate zu oxydierten Mikrosomen das bekannte Typ II-Spektrum entsteht. Die aktivierende Substanz, z.B. Aceton oder auch Metyrapon, verhindern die Bindung von Anilin und Acetanilid an das Hämeisen, z.B. indem sie selbst diese Bindungsstellen besetzen. In diesem Zusammenhang ist es bemerkenswert, daß Metyrapon in oxydierten Mikrosomen von unbehandelten Mäusen eine spektrale Bindungskonstante von etwa $32\mu\text{M}$ hat (Netter, Kahl, Magnussen, 1969), während für Anilin eine spektrale Bindungskonstante von etwa $200\mu\text{M}$ beobachtet wurde (Soliman et al., 1974). Durch die Verdrängung des Anilins bzw. Acetanilids vom Hämeisen steht nun vermehrt Substrat für die Bindung an die Typ I-Bindungsstelle und damit für die Hydroxylierung zur Verfügung. Daß ein solcher Vorgang insbesondere bei hohen Substratkonzentrationen, wie von uns beobachtet, ins Gewicht fällt, erscheint wahrscheinlich. Damit stellt die eben dargestellte Hypothese eine überzeugende Erklärung für das Aktivierungsgeschehen dar, die allerdings noch weiterer experimenteller Bestätigung bedarf.

ZUSAMMENFASSUNG

Metyrapon (2-methyl-1,2-bis- (3-pyridyl) -1-propanon) war bekannt als ein Inhibitor der mikrosomalen Arzneimittelhydroxylierung, bis Leibman (1969) nachweisen konnte, daß Metyrapon je nach seiner Konzentration eine unterschiedliche Wirkung auf die Hydroxylierung von Acetanilid hat. Bei einer Konzentration von 0,5 mM stimulierte Metyrapon die Acetanilidhydroxylierung, bei höheren Metyraponkonzentrationen kehrte sich die Stimulierung in eine Hemmung um (Leibman, 1969).

Ausgehend von den Untersuchungen Leibmans (1969) wird in der vorliegenden Arbeit gezeigt, daß Metyrapon, wenn es den mikrosomalen Suspensionen in einer Konzentration von 0,5 mM zugesetzt wird, je nach der Substratkonzentration unterschiedlich auf die mikrosomale Arzneimittelhydroxylierung wirkt. Anhand von zwei Modellreaktionen, der Hydroxylierung von Anilin und der von Acetanilid, wird gezeigt, daß Metyrapon in unteren Substratkonzentrationen hemmend und in höheren Substratkonzentrationen aktivierend wirkt.

Die Anilinhydroxylierung wurde bei der Substratkonzentration von 1 mM durch Metyrapon um 48% gehemmt. Die Umsatzhemmung durch Metyrapon betrug bei den Substratkonzentrationen von 4 mM 33%, bei 8 mM 14% und bei 16 mM 2%. Bei der Anilinkonzentration von 32 mM konnte in Gegenwart von Metyrapon eine Umsatzsteigerung von 20% gegenüber den Kontrollansätzen gemessen werden. Die Aktivierung der Anilinhydroxylierung fand bei Substratkonzentrationen statt, wo deutliche Substrathemmungen zu verzeichnen waren. Wegen der ausgeprägten Substrathemmung bei höheren Anilinkonzentrationen konnten keine enzyminetischen

Konstanten mit Hilfe des Lineweaver-Burk-Diagramms ermittelt werden.

Die Hydroxylierung von Acetanilid wurde in einer ähnlichen Weise durch Netyrapon beeinflusst. Bei der Acetanilidkonzentration von 0,5mM wurde in Gegenwart von Netyrapon ein um 13% geringerer Umsatz gegenüber den Kontrollansätzen gemessen. Dagegen lag der Umsatz bei der Substratkonzentration von 1mM um 3%, bei der von 2mM um 4% und bei der von 4mM um 21% höher als der der Kontrollansätze. Die umsatzbeschleunigende Wirkung von Netyrapon bei der Acetanilidhydroxylierung wurde auch dann beobachtet, wenn noch keine Substrathemmung vorlag. Als K_m der Kontrollansätze ergab sich 0,35mM bei einer V_{max} von $2,45 \frac{\text{nmole NAPAP}}{\text{min} \times \text{mg Prot.}}$, während in Gegenwart von Netyrapon eine K_m von 0,81mM und eine V_{max} von $3,24 \frac{\text{nmole NAPAP}}{\text{min} \times \text{mg Prot.}}$ gemessen wurde.

Die aktivierende Wirkung des Netyrapons auf die Anilinhydroxylierung und die Acetanilidhydroxylierung war statistisch nicht signifikant, jedoch war eine Tendenz in der aufgezeigten Richtung in allen Einzelversuchen zu erkennen.

In der vorliegenden Arbeit wird ebenfalls gezeigt, daß Netyrapol, der Hauptmetabolit des Netyrapons im endoplasmatischen Retikulum der Leber, ebenfalls je nach der Substratkonzentration sowohl eine hemmende als auch eine aktivierende Wirkung auf die Anilinhydroxylierung in Lebermikrosomen hat. Wenn auch die aktivierende Wirkung nicht statistisch als signifikant gesichert werden konnte, so war eine Tendenz in der aufgezeigten Richtung in allen Einzelversuchen erkennbar. Auch Netyrapol wurde in einer Konzentration von 0,5mM den mikrosomalen Suspensionen zugesetzt. Bei Anilinkonzen-

trationen von 1mM betrug die Hemmung durch Metyrapol 50%, bei 4mM 14% und bei 8mM 3%. Dagegen wurde bei Anilinkonzentrationen von 16mM und 32mM um 28% höhere Umsätze in Gegenwart von Metyrapol gemessen als in den entsprechenden Kontrollansätzen.

Bei der Acetanilidhydroxylierung wirkte Metyrapol in allen Substratkonzentrationen umsatzhemmend. Allerdings war die Umsatzhemmung in oberen Substratkonzentrationen geringer als in unteren.

Es werden mögliche Wirkungsmechanismen des Metyrapons und seines Hauptmetaboliten auf die mikrosomale Arzneimittelhydroxylierung diskutiert und mit anderen umsatzbeschleunigenden Substanzen, die aus der Literatur bekannt sind, verglichen.

LITERATURVERZEICHNIS

- ANDERS, M.W.: Acetone enhancement of microsomal aniline para-hydroxylase activity. Arch.Biochem.Biophys. 126, 269-75 (1968)
- Anders, M.W.: Effect of phenobarbital and 3-methylcholanthrene administration on the invitro enhancement of microsomal aromatic hydroxylation. Arch.Biochem. Biophys. 153, 502-7 (1972)
- ARCOS, J.C., CONNEY, A.H. and N.P. BUU-HOI: Induction of microsomal enzyme synthesis by polycyclic aromatic hydrocarbons of different molecular sizes. J.B.Chem. 236, 1291-6 (1961)
- AXELROD, J.: The enzymatic conversion of codeine to morphine. J.Pharmacol.Exp.Ther. 115, 259-67 (1955)
- BRODIE, B.B. and J. AXELROD: Estimation of acetanilide and its metabolic products, aniline, N-acetyl-p-aminophenol and p-aminophenol (free and total conjugated) in biological fluids and tissues. J.Pharmacol.Exp.Ther. 94, 22-8 (1948)
- BRODIE, B.B. and J. AXELROD: The fate of acetanilide in man. J.Pharmacol.Exp.Ther. 94, 29-38 (1948)
- BRODIE, B.B., G.J. BURNS, L.C. FARLE, F.A. LIEF, E. BERNSTEIN and E.M. PATTER: Fate of pentobarbital in man and dog and method for its estimation in biological material. J.Pharmacol.Exp.Ther. 109, 26-34 (1953)
- BUCHER, O.: Cytologie, Histologie und Mikroskopische Anatomie des Menschen. 8. Auflage. Bern, Stuttgart, Wien (1973), Seite 29

- CHAPLIN, M.D. and G.J. MANNERING: Role of phospholipids in the hepatic microsomal drug-metabolizing system. *Molec. Pharmacol.* 6, 631-40 (1970)
- CHART, J.J., SHEPPARD, H., ALLEN, M.J., BENCZE, W.L. and R. GAUNT: New amphenone analogs as adrenocortical inhibitors. *Experientia* XIV, 151-8 (1958)
- CHHABRA, R.S., GRAM, T.E. and J.R. FOUTS: A comparative study of two procedures used in the determination of hepatic microsomal aniline hydroxylation. *Toxic. Appl. Pharmac.* 22, 50-8 (1972)
- CLARK, H. and G. POWIS: Effect of acetone administered in vivo upon hepatic microsomal drug metabolizing activity in the rat. *Biochem. Pharmacol.* 23, 1015-9 (1974)
- CLAUDE, A.: *Proc. Soc. exp. biol. Med.* 39, 398 (1938); zit. nach CLAUDE, A.: Microsomes, endoplasmatic reticulum and interactions of cytoplasmatic membranes. In: GILLETTE, J.R., CONNEY, A.H., COSMIDES, G.J., ESTABROOK, R.W., FOUTS, J.R. and G.J. MANNERING, (eds.): *Microsomes and drug oxidations*. New York, London (1969)
- COHEN, B.S. and R.W. ESTABROOK: Microsomal electron transport reactions. II. The use of reduced triphosphopyridine nucleotide and-or reduced diphosphopyridine nucleotide for the oxidative N-demethylation of aminopyrine and other drug substrates. *Arch. Biochem. Biophys.* 143, 46-53 (1971)
- CONNEY, A.H., MILLER, E.C. and J.A. MILLER: Substrate-induced synthesis and other properties of benzpyrene hydroxylase in rat liver. *J. B. Chem.* 228, 753-66 (1957)

- CONNEY, A.H. and J.J.BURNS: Factors influencing drug metabolism. *Advanc.Pharmacol.* 1, 31-8 (1962)
- COOPER, D.Y., LEVIN, S., NARASIMHULU, S., ROSENTHAL, O. and R.W.ESTABROOK: Photochemical action spectrum of the terminal oxidase of mixed function oxidase systems. *Science* 147, 400-2 (1965)
- CORREIA, M.A. and G.J.MANNERING: Reduced diphosphopyridine nucleotide synergism of the reduced triphosphopyridine nucleotide-dependent mixed-function oxidase system of hepatic microsomes. *Molec.Pharmacol.* 9, 455-85 (1973)
- DAS, M.L., ORRENIUS, S. and L.ERNSTER: On the fatty acid and hydrocarbon hydroxylation in rat liver microsomes. *Europ.J.Biochem.* 4, 519-23 (1968)
- DÜNGES, W. and G.F.KAHL: Metabolism of metyrapone by a soluble enzyme system in rat liver. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch.Pharmak.* 267, 293-6 (1970)
- ESTABROOK, R.W., COOPER, D.Y. and O.ROSENTHAL: The light reversible carbon monoxide inhibition of the steroid C₂₁-hydroxylase system of adrenal cortex. *Biochem.Z.* 338, 741-55 (1963)
- ESTABROOK, R.W., HILDEBRANDT, A.G., BARON, J., NETTER, K.J. and K.C.LEIBMAN: A new spectral intermediate associated with cytochrome P-450 function in liver microsomes. *Biochem. Biophys.Res.Comm.* 42, 132-9 (1971)
- FOUTS, J.R. and L.A.ROGERS: Morphological changes in the liver accompanying stimulation of microsomal drug metabolizing enzyme activity by phenobarbital, chlordane, benzpyrene or methylcholanthrene in rats. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 147, 112-9 (1965)

- GIGON, P.L., GRAM, T.E. and J.R. GILLETTE: Studies on the rate of reduction of hepatic microsomal cytochrome P-450 by reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate: effect of drug substrates. *Molec. Pharmacol.* 5, 109-22 (1969)
- GILLETTE, J.R., BRODIE, B.B. and B.N. LA DU: The oxidation of drugs by liver microsomes: on the role of TNH and oxygen. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 119, 532-40 (1957)
- GILLETTE, J.R.: Proc. 1st. Intern. Pharmacol. Meeting Stockholm, 1961, Vol. VI p. 13, Pergamon, London (1962); zit. nach SCHENKMAN, J.B., REMMER, H. and R.W. ESTABROOK: Spectral studies of drug interaction with hepatic microsomal cytochrome. *Molec. Pharmacol.* 3, 113-23 (1967)
- HILDEBRANDT, A.G., LEIBMAN, K.C. and R.W. ESTABROOK: Metyrapone interaction with hepatic microsomal cytochrome P-450 from rats treated with phenobarbital. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 37, 477-85 (1969)
- HILDEBRANDT, A.G. and R.W. ESTABROOK: Evidence for the participation of cytochrome b_5 in hepatic microsomal mixed-function oxidation reactions. *Arch. Biochem. Biophys.* 143, 66-79 (1971)
- IMAI, Y. and R. SATO: Substrate interaction with hydroxylase system in liver microsomes. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 22, 620-6 (1966, a)
- IMAI, Y. and R. SATO: Activation and inhibition of microsomal hydroxylation by ethyl isocyanide. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 25, 80-6 (1966, b)
- IMAI, Y. and R. SATO: Studies on the substrate interactions with P-450 in drug hydroxylation by liver microsomes. *J. Biochem.* 62, 239-49 (1967)

- JENKINS, J.S., MEAKIN, J.W. and D.H. NELSON: A comparison of the inhibitory effects of 2-methyl-1,2-bis-(3-pyridyl)-1-propanone and amphenone B on adrenal cortical secretion in the dog. *Endocrinology* 64, 572-82 (1959)
- JENNY, M., RIONDEL, A.M. und A.F. MÜLLER: Applications diagnostiques et thérapeutiques d'un nouvel adrenostatique, le SU 4885 (Metopirone). *Schweiz. med. Wschr.* 92, 311-6 (1962)
- JENNY, M.: Die Beziehungen zwischen Hypophysen- und Nebennierenrindenfunktion. *Documenta Geigy, Acta clinica* Nr. 10 (1970)
- JICK, H. and L. SHUSTER: The turnover of microsomal reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-cytochrome c reductase in the liver of mice treated with phenobarbital. *J.B.Chem.* 241, 5366-9 (1966)
- JONEN, H.G.: Spektralanalytische Befunde zur Wechselwirkung von Pyridinderivaten mit dem Cytochrom P-450. *Med. Diss. Mainz* (1973)
- JONEN, H.G., HÜTHWOHL, B., KAHL, R. and G.F. KAHL: Influence of pyridine and some pyridine derivatives on spectral properties of reduced microsomes and on microsomal drug metabolizing activity. *Biochem. Pharmacol.* 23, 1319-29 (1974)
- KAHL, G.F.: Experiments on the metyrapone reducing microsomal enzyme system. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 266, 61-74 (1970)
- KAHL, G.F., MINCK, K. and K.J. NETTER: Enhancement of type II substrate oxidation and of azo reduction in the isolated rat liver and in vitro by metyrapone. *Drug Metabolism and Disposition* 1, 191-2 (1973)

- KAHL, R., TÜTTENBERG, K.H., NIEDERMEIER, F. und G.F. KAHL:
Evidence for oxidative metabolism of metyrapone
in rat liver microsomes. Naunyn-Schmiedeberg's
Arch. Pharmak. 282, Suppl., R 44 (1974)
- KLINGENBERG, M.: Pigments of rat liver microsomes.
Arch. Biochem. Biophys. 75, 376-86 (1958)
- KRAULIS, I. and M.K. BIRMINGHAM: Hydroxylation sequences
in rat adrenal steroids and effects of SU 4885 on
C₁₈-oxygenation. Fed. Proc. 22, 530-6 (1963)
- KRISCH, K. und H. STAUDINGER: Research on enzymatic
hydroxylation. Hydroxylation of acetanilide and
its relation to microsomal pyridine nucleotide
oxidation. Biochem. Z. 334, 312-27 (1961)
- KRISCH, K., STAUDINGER, H. und V. ULLRICH: Reaction of
aniline with the primary acid product of DPNH
and TPNH. Life Sci. 3, 97-102 (1964)
- KRÖBER, F., LANGE, G., MATHES, S. und G. MOR: Qualitative
Änderungen in Lebermikrosomen Phenobarbital-be-
handelter Kaninchen. Naunyn-Schmiedeberg's Arch.
Pharmak. 267, 307-26 (1970)
- KUNTZMAN, R., JACOBSON, M., SCHNEIDMAN, K. and A.H. CONNEY:
Similarities between oxidative drug-metabolizing
enzymes and steroid hydroxylase in liver micro-
somes. J. Pharm. Exp. Ther. 146, 280-5 (1964)
- LA DU, B.N., GAUDETTE, L., TROUSOF, N. and B.B. BRODIE:
Enzymatic dealkylation of aminopyrine (pyramidon)
and other alkylamines. J. Biol. Chem. 214, 741 (1955)
- LEIBMAN, K.C.: Effects of metyrapone on liver microsomal
drug oxidations. Molec. Pharmacol. 5, 1-9 (1969)

- LEIBMAN, K.C., HILDEBRANDT, A.G. and R.W. ESTABROOK:
Spectrophotometric studies of interactions between various substrates in their binding to microsomal cytochrome P-450. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 36, 789-94 (1969)
- LEIBMAN, K.C.: Reduction of ketones in liver cytosol. *Xenobiotica* 1, 97-104 (1971)
- LEIBMAN, K.C. and R.W. ESTABROOK: Effects of extraction with isooctane upon the properties of liver microsomes. *Molec. Pharmacol.* 7, 26-32 (1971)
- LEIBMAN, K.C. and E. ORTIZ: Metyrapone and other modifiers of microsomal drug metabolism. *Drug Metabolism and Disposition* 1, 184-9 (1973)
- LEYBOLD, K. und H.J. STAUDINGER: Geschlechtsunterschiede im Steroidstoffwechsel von Rattenlebermikrosomen. *Biochem. Z.* 331, 389-98 (1959)
- LIDDLE, G.W., ISLAND, D., LANCE, E.M. and A.P. HARRIS: Alterations of adrenal steroid patterns in man resulting from treatment with a chemical inhibitor of 11 β -hydroxylation. *J. Clin. Endocr.* 18, 906-12 (1958)
- LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L. and R.J. RANDALL: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. B. Chem.* 193, 265 (1951)
- MANNERING, G.J.: Significance of stimulation and inhibition of drug metabolism in pharmacological testing. In: *Selected Pharmacological Testing Methods*, ed. by A. Burger, pp 51-119, Marcel Dekker, New York (1968)
- MANNERING, G.J.: Microsomal enzyme systems which catalyze drug metabolism. In: *Fundamentals of drug metabolism and drug disposition*, ed. by B.N. LaDu, H.G. Mandel, E.L. Way, pp 206-252, Baltimore (1971)

- MASON, H.S.: Mechanisms of oxygen metabolism. Adv.Enzym. 19, 79-233 (1957)
- MITOMA, C. and S. UDENFRIEND: Enzymatic hydroxylation of aromatic drugs. J.Pharmacol.Exp.Ther. 113, 40 (1955)
- MITOMA, C., ROSNER, H.S., REITZ, H.C. and S. UDENFRIEND: Enzymatic hydroxylation of aromatic compounds. Arch.Biochem.Biophys. 61, 431 (1956)
- MIYAKE, Y., MASON, H.S. and W. LANDGRAF: An electron spin resonance study of liver and adrenal mixed function oxidases near the temperature of liquid helium. J.B.Chem. 242, 393-7 (1967)
- NETTER, K.J., JENNER, S., und K. KAJUSCHKE: Über die Wirkung von Metyrapon auf den mikrosomalen Arzneimittellabbau. Naunyn-Schmiedebergs Arch.Pharmak. exp.Path. 259, 1-16 (1967)
- NETTER, K.J., KAHL, G.F. und M.P. MAGNUSSEN: Kinetic experiments on the binding of metyrapone to liver microsomes. Naunyn-Schmiedebergs Arch.Pharmak. 265, 205-15 (1969)
- NISSEN, G.: Beschleunigung der Acetanilidhydroxylierung an der isolierten Leber durch Metyrapon. Med.Diss. Mainz (1974)
- OMURA, T. and R. SATO: The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. I. Evidence for its hemoprotein nature. J.B.Chem. 239, 2370-8 (1964)
- OMURA, T., SATO, R., COOPER, D.Y., ROSENTHAL, O., R.W. ESTABROOK: Function of cytochrome P-450 of microsomes. Fed. Proc. 24, 1181-9 (1965)
- ORRENIUS, S. and L. ERNSTER: Phenobarbital-induced synthesis of the oxidative demethylation enzymes of rat liver microsomes. Biochem.Biophys. Res. Commun. 16, 60 (1964)

- ORRENIUS, S., DALLNER, G. and L. ERNSTER: Inhibition of the TPNH-linked lipid peroxidation of liver microsomes by drugs undergoing oxidative demethylation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 14, 329 (1964)
- PALADE, G. E.: Electron microscopy of mitochondria and other cytoplasmatic structures. In: O. H. GABLER: *Enzymes, units of biological structures and function.* Academic Press, New-York (1956)
- POWIS, G. and A. R. BOOBIS: The effect of pretreating rats with 3-methylcholanthrene upon the enhancement of microsomal aniline hydroxylation by acetone and other agents. *Biochem. Pharmacol.* 24, 424-6 (1975)
- REMMER, H.: Der beschleunigte Abbau von Pharmaka in den Lebermikrosomen unter dem Einfluß von Luminal. *Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmacol.* 235, 279-90 (1959)
- REMMER, H. und H. J. MERKER: Enzyminduktion und Vermehrung von endoplasmatischem Retikulum in der Leberzelle während der Behandlung mit Phenobarbital (Luminal). *klin. Wschr.* 41, 276-82 (1963)
- REMMER, H., SCHENKMAN, J., ESTABROOK, R. W., SASANE, H., GILLETTE, J., COOPER, D. Y., NARASIMHULU, S. and O. ROSENTHAL: Drug interaction with hepatic microsomal cytochrome. *Molec. Pharmacol.* 2, 187-90 (1966)
- SANZARI, H. P. and F. G. FÉRON: Influence of metopirone on substrate-supported hydroxylation of DOC by rat adrenal mitochondria. *Steroids* 8, 929-34 (1966)
- SASANE, H. A. and J. R. GILLETTE: Studies on the relationship between the effects of various substances on absorption spectrum of cytochrome P-450 and the reduction of p-nitrobenzoate by mouse liver microsomes. *Molec. Pharmacol.* 5, 123-30 (1969)

- SASANE, H.A. and J.R. GILLETTE: Studies on the inhibitory effects of various substances on drug metabolism by liver microsomes: the effect of nicotinamide in altering the apparent mechanism of inhibition. *Biochem. Pharmacol.* 19, 1025-41 (1970)
- SCHENKMAN, J., REMMER, H. and R.W. ESTABROOK: Spectral studies of drug interactions with hepatic microsomal cytochrome. *Molec. Pharmacol.* 3, 113-123 (1967)
- SCHENKMAN, J. and R. SATO: The relationship between the pH-induced spectral change in ferriprothemo and the substrate-induced spectral change of the hepatic microsomal mixed-function oxidase. *Molec. Pharmacol.* 4, 613-20 (1968)
- SCHENKMAN, J.: Studies on the nature of the type I and type II spectral changes in liver microsomes. *Biochemistry* 9, 2081 (1970)
- SHOEMAN, D.W., VANE, F.M. and G.J. MANNERING: Induction of metabolism. VII. Differences in P-420 hemoproteins from untreated and 3-methylchanthrene-treated rats. *Molec. Pharmacol.* 9, 372-82 (1973)
- SLADEK, N.E. and G.J. MANNERING: Evidence for a new hemoprotein in hepatic microsomes from methylcholanthrene treated rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 24, 668-74 (1966)
- SOLIMAN, M.R.I., JOHNSON, H.D., WADE, A.E.: The interactions of inducers, inhibitors, and substrates of drug-metabolizing enzymes with rat liver cytochrome P-450. *Drug Metab. Disposition* 2, 87-96 (1974)
- STEVENS, J.P., MC PHILLIPS, J.J. and R.E. SPITZEL: In vitro enhancement of aniline metabolism by paraoxone. *Toxicol. and Appl. Pharmacol.* 23, 208-15 (1972)

VAINIO, H. and D. HÄNNINEN: Enhancement of aniline p-hydroxylation by acetone in rat liver microsomes. *Xenobiotica* 2, 259-67 (1972)

WADA, F., SHIBATA, H., GOTO, M. and Y. SAKAMOTO: Participation of microsomal electron transport system involving cytochrome P-450 in ω -oxidation of fatty acids. *Biochim. Biophys. Acta (Amst.)* 162, 518-24 (1968)

LEBENS LAUF

Am 24. Dezember 1949 wurde ich als zweiter Sohn des Verwaltungsangestellten Karl Henrichs und dessen Ehefrau Margot, geborene Weyer, in Dickendorf (Kreis Altenkirchen) geboren. Dort besuchte ich vom 1.4.1956 bis zum 31.3.1960 die Evangelische Volksschule, danach das Staatliche Freiherr-vom-Stein-Gymnasium in Betzdorf/Sieg, wo ich am 20.6.1968 die Reifeprüfung ablegte.

Das Medizinstudium nahm ich im Sommersemester 1969 an der Johannes Gutenberg Universität in Mainz auf und legte dort am 10. Dezember 1974 die Ärztliche Prüfung ab.

Außerdem studierte ich vom Wintersemester 1972 an Soziologie.

Seit dem 1. Februar 1975 arbeite ich als Medizinalassistent in der Inneren Abteilung des Krankenhauses Paulinenstift in Wiesbaden.

Die Untersuchungen zum Thema dieser Arbeit führte ich in den Jahren 1972 und 1973 am Pharmakologischen Institut der Johannes Gutenberg Universität Mainz durch.

Chemoprint-Druck 63 Gießen Frankfurter Str. 131 Ruf (06 41) 2 17 12